

**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**  
**ESCUELA DE TECNOLOGIA MÉDICA**



**DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL MEDIANTE PCR TIEMPO REAL  
EN MUJERES INDÍGENAS DEL ECUADOR 2016**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO**

**AUTORES:**

JOHN PATRICIO CAGUANA MAYANCELA

CI.0302300983

CHRISTIAN SANTIAGO CARREÑO CALLE

CI. 0105060172

**DIRECTOR:**

PhD. MANUEL ALFREDO CAMPOVERDE CISNEROS

CI. 0102517265

CUENCA-ECUADOR

2017



## Resumen

**Introducción.-** El tamizaje para la detección de enfermedades de transmisión sexual, algunas de ellas productoras de cáncer como lo es el virus del papiloma humano, a más de ser factores de infertilidad y esterilidad, depende cada vez más del uso de técnicas moleculares. Un desafío importante para los países en desarrollo como lo es el Ecuador, ha sido la falta de disponibilidad y costos de las pruebas basadas en la detección del ADN del microorganismo. En este estudio se diagnosticaron microorganismos de transmisión sexual mediante qPCR en mujeres de nacionalidades indígenas del Ecuador.

**Metodología.-** En el laboratorio de biología molecular de la FFCCMM de la Universidad de Cuenca se realizó un estudio descriptivo, que consistió en diagnosticar microorganismos de transmisión sexual en muestras cervicouterina mediante técnicas moleculares de qPCR HPV-28 y STI-7 Anyplex, las mismas que procedieron de mujeres indígenas de las provincias de Loja, Morona Santiago y Cañar.

**Resultados.-** Se analizaron un total de 396 muestras, de los cuales 120 fueron extraídas en el cantón Saraguro, 131 de la comunidad de Quilloac y 145 de la comunidad de Sevilla don Bosco. Dentro de las muestras analizadas determinaron 135 muestras que presentaban genotipos alto riesgo y bajo riesgo oncogénico de HPV, así como 362 muestras que presentaban otros microorganismos de transmisión sexual.

**Conclusiones.-** La implementación de técnicas moleculares como lo es el qPCR, para el diagnóstico de microorganismos de transmisión sexual sugiere ser rápida, sencilla con una alta sensibilidad y especificidad.

**Palabras clave:** REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (QPCR), GENOTIPO, ECUADOR, INFECCIONES DE TRANSMISION SEXUAL (ITS), VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV), DIAGNOSTICO, ETNIAS.



## Abstract

**Background** Screening test for the detection of sexually transmitted diseases, some of them producing cancer such as human papilloma virus, besides being factors of infertility and infertility, depends increasingly on molecular techniques. An important challenge for developing countries like Ecuador has been the lack of availability and costs of tests based on the detection of the DNA of the microorganism. In this study, microorganisms of sexual transmission were diagnosed by qPCR in women of indigenous nationality Ecuador.

**Methodology** Inside the laboratory of molecular biology of the Cuenca University, a descriptive study was carried out to diagnose sexually transmitted microorganisms in cervical samples using molecular techniques of HPV-28 and STI-7 Anyplex qPCRs. The samples came from woman indigenous from the provinces of Loja, Morona Santiago and Cañar.

**Results** 396 samples were analyzed, 120 samples were extracted in Saraguro, 131 in Quilloac community, 145 in Seville Don Bosco community. 135 samples showed high risk and low oncogenic HPV risk genotypes, also 362 samples with other sexually transmitted microorganisms.

**Conclusions** Implementing molecular techniques such as qPCR, for the diagnosis of microorganisms of sexual transmission are fast, simple with a high sensitivity and specificity.

**KEYWORDS:** QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (QPCR), GENOTYPE, ECUADOR, SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS (STIS), HUMAN PAPILLOMA VIRUS (HPV), DIAGNOSTICS, ETHNIC GROUPS.



## Tabla de Contenidos

|   |    |
|---|----|
| Resumen.....  | 2  |
| Abstract .....  | 3  |
| CAPITULO I.....   | 13 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN .....  | 13 |
| 1.2 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.....  | 13 |
| 1.3 JUSTIFICACIÓN.....  | 14 |
| CAPITULO II.....  | 15 |
| 2 FUNDAMENTO TEÓRICO .....  | 15 |
| 2.1 INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL .....   | 15 |
| 2.1.1 Virus del Papiloma Humano.....  | 16 |
| 2.1.2 Ureaplasma parvum .....   | 21 |
| 2.1.3 Ureaplasma Urealiticum.....   | 21 |
| 2.1.4 Chlamydia trachomatis .....   | 21 |
| 2.1.5 Mycoplasma hominis .....  | 22 |
| 2.1.6 Neisseria gonorrhoeae .....   | 22 |
| 2.1.7 Mycoplasma genitalium .....   | 22 |
| 2.1.8 Trichomona vaginalis .....  | 22 |
| 2.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA qPCR .....  | 25 |
| 2.4 Reacción en Cadena de la polimerasa qPCR aplicado al diagnóstico de microorganismos de Transmisión sexual ..... | 27 |
| 2.4.1 Anyplex <sup>TM</sup> II STI-7 .....  | 27 |
| 2.4.2 Anyplex II Detección HPV 28 .....   | 29 |
| CAPITULO III.....   | 32 |
| 3. OBJETIVOS .....  | 32 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL.....   | 32 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....   | 32 |
| CAPITULO IV .....   | 33 |
| 4. DISEÑO METODOLÓGICO .....  | 33 |
| 4.1 TIPO DE ESTUDIO.....  | 33 |
| 4.2 AREA DE ESTUDIO .....   | 33 |



|   |    |
|---|----|
| 4.3 UNIVERSO Y MUESTRA .....                | 33 |
| 4.4 CRITERIO DE INCLUSION Y EXCLUSION ..... | 34 |
| 4.5 VARIABLES .....                         | 34 |
| 4.6 MÉTODOS TÉCNICAS E INSTRUMENTOS .....   | 34 |
| 4.7 PROCEDIMIENTOS .....                    | 35 |
| 4.8 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS .....     | 39 |
| 4.9 ASPECTOS ÉTICOS .....                   | 40 |
| CAPÍTULO V .....                            | 41 |
| 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....             | 41 |
| Tabla N°1 .....                             | 41 |
| Tabla N°2 .....                             | 43 |
| Tabla N°3 .....                             | 44 |
| Tabla N°4 .....                             | 45 |
| GRAFICO N°1 .....                           | 46 |
| CAPITULO VI .....                           | 48 |
| 6. DISCUSIÓN .....                          | 48 |
| 7. CONCLUSIONES .....                       | 51 |
| 8. RECOMENDACIONES .....                    | 52 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA .....                       | 53 |
| 10. ANEXOS .....                            | 57 |
| ANEXO 1 .....                               | 57 |
| ANEXO 2 .....                               | 59 |
| ANEXO 3 .....                               | 61 |
| ANEXO 4 .....                               | 62 |
| ANEXO 5 .....                               | 63 |
| ANEXO 6 .....                               | 66 |
| ANEXO 7 .....                               | 67 |



## Derecho de Autor

John Patricio Caguana Mayancela, autor del Trabajo de Titulación “(Diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual mediante PCR tiempo Real en mujeres indígenas del Ecuador 2016)”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Licenciado en Laboratorio Clínico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca 19/04/2017

---

John Patricio Caguana Mayancela

C.I: 0302300983



## Derecho de Autor

Christian Santiago Carreño Calle, autor del Trabajo de Titulación “(Diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual mediante PCR tiempo Real en mujeres indígenas del Ecuador 2016)”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Licenciado en Laboratorio Clínico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca 19/04/2017

---

Christian Santiago Carreño Calle

C.I: 0105060172



## Responsabilidad

John Patricio Caguana Mayancela, autor del Trabajo de Titulación “Diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual mediante PCR tiempo Real en mujeres indígenas del

Ecuador 2016”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 19/04/2017

John Patricio Caguana Mayancela

C.I: 0302300983





## Responsabilidad

Christian Santiago Carreño Calle, autor del Trabajo de Titulación “Diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual mediante PCR tiempo Real en mujeres indígenas del

Ecuador 2016”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 19/04/2017

Christian Santiago Carreño Calle

C.I: 0105060172



## **DEDICATORIA**

A Dios por la sabiduría que me ha dado a lo largo de la vida y la carrera. A mi esposa e hija por ser el motivo de lucha diaria y a mis padres por su apoyo incondicional.

**John**



## **DEDICATORIA**

A mis padres, abuelos, tíos por el gran apoyo, confianza y cariño que me brindaron en todo el trayecto de mi vida y estudios. A lo largo de estos años han demostrado su amor incondicional a pesar de mis equivocaciones corrigiéndome y alentándome siempre con amor.

A mi esposa e hijo por soportar mi ausentismo por las largas jornadas de estudio e internado sabiendo brindarme su amor y darme las fuerzas necesarias para superar todos los obstáculos que me han llevado a culminar con éxito mi carrera.

**Christian**



## AGRADECIMIENTO

Llenos de un eterno agradecimiento por haber culminado con este trabajo, agradecemos a la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Tecnología Médica Carrera de Laboratorio Clínico por habernos brindado la oportunidad de estar en sus aulas así también al cuerpo de docentes, personal administrativo, que a lo largo de estos años nos brindaron su amistad a más del conocimientos que nos impartieron en las aulas.

A nuestro director de tesis, maestro y sobre todo amigo PhD. Manuel Alfredo Campoverde Cisneros que además de orientarnos e impartir su conocimiento nos brindó su confianza, amistad y compromiso durante nuestra vida estudiantil.

Además de un eterno agradecimiento al grupo de investigadores del proyecto HPV Etnias guiado por el PhD. José Ortiz Segarra por su apoyo incondicional y la confianza depositada en nosotros.

Finalmente agradecer a las mujeres que formaron parte de esta investigación, a los diferentes grupos de profesionales de las diversas Ciudades con los que tuvimos la suerte de trabajar y en especial a la Lcda. Doris Jiménez y a su esposo que tuvieron la amabilidad de acogernos en su morada y de compartir junto a nosotros gratos recuerdos.



## CAPITULO I

### 1.1 INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituye una herramienta de diagnóstico importante en la detección de microorganismos, que consiste en hacer muchas copias de una región específica del ADN, utilizando una enzima Taq polimerasa que permitirán producir nuevas cadenas de ADN, mediante el uso de cadenas existentes como molde, una corta cadena de nucleótidos que proporciona un punto de partida para la síntesis de ADN. Dentro del trabajo investigativo se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de microorganismos de transmisión sexual tales como el virus del papiloma humano, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Trichomona vaginalis*. (31)

La investigación forma parte del proyecto “Diseño de un programa de promoción de salud sexual y reproductiva y de prevención de VPH y de enfermedades de transmisión sexual para mujeres de Pueblos y Nacionalidades Indígenas KYCHWA y SHUAR del Ecuador, año 2015-

2017” que consiste en determinar los microorganismos de transmisión sexual mediante la técnica biomolecular de la reacción en cadena de la polimerasa.

El objetivo del presente trabajo fue diagnosticar mediante técnicas biomoleculares qPCR Real Time genotipos del virus del papiloma humano, así como genes presentes en microorganismos de transmisión sexual antes mencionados, en mujeres de nacionalidades indígenas del Ecuador.

### 1.2 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En países en vía de desarrollo las ITS y sus complicaciones se encuentran entre las cinco causas de demanda de atención sanitaria. Se estima que anualmente unos 357 millones de personas contraen alguna de las siguientes enfermedades Clamidiasis, Gonorrea, Sífilis o Tricomoniasis, donde podemos encontrar también el virus del Papiloma Humano.(32)

Los métodos actuales para el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual se basan en la microscopía, inmunofluorescencia y las pruebas screening. Estas técnicas no permiten



detectar el patógeno de forma temprana, así como su genotipo debido a la baja sensibilidad y especificidad que presentan dichas técnicas.(33)

Hasta la fecha, a diferencia de la PCR convencional, que solo permite un diagnóstico cualitativo no hay métodos que permitan cuantificar la carga viral de manera absoluta y confiable, por tanto una técnica que permite compensar estas desventajas es la PCR en Tiempo Real. Sus características incluyen desde una alta sensibilidad y especificidad hasta una mejora en el tiempo de procesamiento, el ahorro de materiales y reactivos a más de producir menor daño al personal que lo manipula, debido a su bajo nivel oncogénico. (33)

Actualmente son pocos los laboratorios que disponen de esta tecnología para el diagnóstico de microorganismos relacionados con enfermedades de transmisión sexual y otras patologías, debido a la falta de capacitación, altos costos, carencia de personal calificado para el uso y manejo de los equipos que implican la realización de la prueba PCR en tiempo real.

Debido al desconocimiento de esta técnica, la investigación demostró que se puede aplicar la misma en el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual y en otras patologías.

## **1.3 JUSTIFICACIÓN**

Contribuir con el mejoramiento de la calidad de vida de las participantes, en razón de que una vez publicados los resultados, los mismos serán empleados por el proyecto “Diseño de un programa de promoción de salud sexual y reproductiva y de prevención de VPH y de enfermedades de transmisión sexual para mujeres de Pueblos y Nacionalidades Indígenas KYCHWA y SHUAR del Ecuador, año 2015-2017” y el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, iniciando con un correcto tratamiento. Así mismo la descripción de la técnica podrá ser utilizada por estudiantes y personal de salud, sirviendo de guía didáctica y práctica.



## CAPITULO II

### 2 FUNDAMENTO TEÓRICO

#### 2.1 INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Son infecciones que se propagan por medio de las relaciones sexuales pueden ser causadas por hongos, parásitos, bacterias y virus son las causantes de esterilidad, embarazo ectópico, cáncer genital y en el peor de los casos la muerte, así como otros daños a la salud humana. (1)

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) o llamadas también enfermedades venéreas constituyen un conjunto de entidades clínicas infectocontagiosas, agrupadas en las que se incluyen en este estudio. (Virus del papiloma humano, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Trichomona vaginalis*). Las ITS se propagan predominantemente por contacto sexual, incluidos el sexo vaginal, anal y oral. (2) Puesto que la infección de patógenos de transmisión sexual puede ser causante de esterilidad e infecciones diseminadas, ensayos moleculares han permitido diagnosticar y tratar dichos patógenos de forma temprana produciendo que se disemine el microorganismo.

Según la OMS se estima que, anualmente, unos 357 millones de personas contraen alguna de las cuatro infecciones de transmisión sexual (ITS) siguientes: clamidias, gonorrea, sífilis o tricomoniasis y que diariamente más de 1 millón de personas contraen una infección de transmisión sexual y de estas se sabe que más de 290 millones de mujeres están infectadas con el virus del papiloma humano. (2)

En la mayoría de los casos, las ITS son asintomáticas o solo van acompañadas de síntomas leves que no necesariamente permiten un diagnóstico certero, más allá del efecto inmediato de la infección en sí misma, las ITS pueden tener consecuencias graves, entre ellas la esterilidad o la transmisión de infecciones de la madre al niño otro problema relacionado es la fármaco resistencia, especialmente en relación con la gonorrea, es un obstáculo importante que dificulta la reducción de las ITS en todo el mundo(2) por lo que la implementación de una técnica para la detección y por ende de un diagnóstico certero se hace indispensable para reducir el número creciente de casos.



## 2.1.1 Virus del Papiloma Humano

### Historia

El conocimiento molecular de las enfermedades de transmisión sexual, así como las causadas por el virus del papiloma humano ha permitido conocer mejor su relación con lesiones tumorales y el control mediante vacunas. En laboratorio el diagnóstico basado tanto en técnicas moleculares como en otros procedimientos como la identificación mediante técnicas de espectrometría de masas, proporcionan un diagnóstico casi instantáneo, con una sensibilidad mejor que las técnicas de cultivo más convencionales. (3)

Gracias a técnicas moleculares hoy se sabe que los humanos modernos portamos el virus del papiloma humano (VPH) ya que nuestros ancestros se relacionaron sexualmente con hombres y mujeres de Neandertal y Denisova, alrededor de 100.000 años atrás, según un trabajo publicado en la revista Molecular Biology and Evolution.(4)

El virus del papiloma humano fue descrito y referenciado por primera vez en la edición de The New York Times del 12 de febrero de 1985. En el artículo menciona que varios científicos entre los que destaca el Dr. Harald zur Hausen, de la universidad de Heidelberg quien estableció la relación entre virus del papiloma y cánceres especialmente cánceres de cérvix y vulva. Por este trabajo, el Dr. Harald zur Hausen sería posteriormente galardonado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2008(5)

Posteriormente el 2 de agosto del año 2002, The New York Times mencionó acerca de una posible vacuna desarrollada por Merck & Co y que la misma inmunizará a los pacientes frente los serotipos del virus de papiloma HPV-16 y HPV-18, causantes del 70% de todos los casos de cáncer cervical. (5)

El 9 de junio de 2006), Gardasil® fue autorizada por la Food and Drug American Administration para su empleo en mujeres con edades entre los 9 años y los 26 años. La autorización para su empleo en hombres llegó tres años más tarde el 17 de octubre de 2009. (5)

### Datos epidemiológicos

El virus del papiloma humano se ha convertido en la infección de transmisión sexual más alta en el mundo ya que afecta a hombres y mujeres por igual además de ser asociado con cáncer





de ano, vulva, vagina, pene.(6) Especialmente en las mujeres provoca el cáncer cervico uterino cuarto cáncer más frecuente en la mujer a nivel mundial, datos del año 2012 aseguran que aparecieron 53.0000 nuevos casos que representan el 7.5% de las muertes femeninas por cáncer, el problema se torna más grave ya que el total de defunciones 85% de 270.000 corresponde a países en desarrollo(7).

Las mujeres generalmente se infectan poco después del inicio de la vida sexual la mayoría menores de 25 años (14 -15) actualmente se sabe exactamente que la infección persistente de alto riesgo es la causante total de los casos de cáncer cervico uterino(6).

Dadas las cifras tan altas de infección por virus de papiloma humano y su desarrollo a cáncer cervico uterino en este proyecto se ve la necesidad de implementar medidas y campañas de prevención. En el año 2012 en el Ecuador 664 mujeres murieron de cáncer de cuello uterino y se estimó que la incidencia para el 2013 sería de 15.8 por cada 100.000 habitantes, según el registro Nacional de Tumores Solca-Quito (8)

## **Tipos de virus del papiloma humano**

Los tipos de VPH transmitidos por vía sexual son alrededor de 40, de los cuales existen 2 grupos los denominados de alto riesgo y los de bajo riesgo. Los denominados de bajo riesgo son: 6, 11, 24, 43, 44 de los cuales los de mayor prevalencia son 6 y 11 que producen verrugas genitales tanto en hombres como en mujeres. Por otro lado los de alto riesgo corresponden a : 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70 de estos el más importante y frecuente es el 16.(9)

## **Características del virus de papiloma humano**

Son virus de ADN de estructura icosaédrica constituida por alrededor de 72 capsómeros, el virión mide 45-55 nm diámetro y consta de un núcleo central de ADN acompañado de una cápsula proteica que lo cubre. La molécula de ADN es de doble banda en forma de círculo cerrado con 7800 a 7900 pares de bases. (10)

El genoma viral se encuentra organizado en tres regiones principales: dos regiones codificadoras de proteínas o regiones precoz y una región no codificante pero sí reguladora (upstream regulatory región, URR). (11)



**PROTEÍNA E1** El gen E1 es el más grande y uno de los más conservados es una helicasa hexamérica que depende de ATP, participa en la replicación del ADN viral. (13)

**LA PROTEÍNA E2** Modula el ciclo replicativo viral. E2 se expresa en concentraciones relativamente elevadas, en células diferenciadas de las capas intermedias de las lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales. Por otra parte, su expresión se encuentra disminuida con la progresión de lesiones y está ausente en la mayoría de los tumores in situ. (13)

**LA PROTEÍNA E4** Precede la formación de proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales, esta proteína E4 se localiza asociada con los filamentos intermedios de queratina, los mismos que afectan la estabilidad mecánica de la red de queratina, lo que facilita la liberación de los viriones. (13)

**LA PROTEÍNA E5** Sirve de acoplamiento y regulación de la actividad de los receptores de los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el derivado de las plaquetas (PDGFR). (13)

**La proteína E6** Aproximadamente de 150 aminoácidos y contiene cuatro motivos CXXC que forman dos regiones de unión al zinc. Se ha demostrado que un número de proteínas E6 de los VP enlazan el zinc a través de la coordinación de residuos de cisteínas además se sabe que interactúan con la proteína p53 que son supresora de tumores. (13)

**PROTEÍNA E7** La proteína E7 y Otras oncoproteínas en la transformación celular es el supresor de tumor pRb. La proteína pRb representa una familia de proteínas relacionada, que se unen a los factores de transcripción E2F y bloquean su función de activación transcripcional. (13)

**PROTEÍNA L1** Es la principal estructura de la cápside ya que por esta se da la entrada del virus a la célula epitelial, la proteína L1 es el elemento estructural primario, encontrándose 360 copias de la proteína que se organiza en 72 capsómeros, en los viriones infectantes.

**La proteína L2** Es un componente menor del virón y se encuentra presente en el centro de los capsómeros. Esta proteína L2 interviene en la localización de los componentes virales en el núcleo y en la unión al ADN, en la formación de la cápside y en la estabilidad. (14)

## **Cáncer por Virus del papiloma humano**



En la mayoría de los casos las infecciones son transitorias y asintomáticas el 70% de las mujeres con infecciones por el VPH se tornan negativas en un año y hasta el 91% de ellas se tornan negativas por el ADN del VPH en dos años. Las infecciones por virus de papiloma humano 16, tienden a persistir más tiempo que las infecciones por otros tipos de VPH, pero en su mayoría son indetectables a los 2 años. (16)

Se cree que el desarrollo gradual de una respuesta inmunitaria eficaz es el mecanismo más probable para el aclaramiento del ADN del VPH, sin embargo, también es posible que el virus permanezca presente. (16)

## **Ciclo de vida del papiloma humano**

El ciclo de vida del HPV está ligado a la diferenciación de la célula huésped infectada además la expresión de altos niveles de proteínas virales, el ensamblaje viral ocurre casi exclusivamente en las capas superiores del cuello uterino (estrato espinoso y en el epitelio granuloso del epitelio escamoso). (14)

Las células de la capa basal consisten de células troncales y células de transición que se multiplican continuamente y proveen un reservorio de células para las regiones suprabasales. (14)

La infección de estas células por virus del papiloma humano conduce a la activación de la expresión en cascada de los genes virales que provoca la producción de aproximadamente 20 a 100 copias extracromosómicas del ADN viral por célula. (14)

Este promedio de copias es mantenido en las células basales indiferenciadas a través del curso de toda la infección. La integración viral ocurre en las células que contienen este número de episomas. En los episomas, la expresión de genes virales es mínima y sobre todo la expresión de los oncogenes E6 y E7 que están bajo un control muy estricto, y sus proteínas son discretamente detectables. (14)

Cuando el queratinocito infectado entra al compartimento de diferenciación este sale del ciclo celular dado que hay una regulación positiva de la expresión de los genes virales, y la replicación del ADN viral, entonces el número de copias virales aumenta a 1000 copias por



célula y se observa abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 y de los genes tardíos. (14)

Las infecciones genitales del HPV son transmitidas principalmente por contacto sexual, que se atribuye a la presencia de microabrasiones del epitelio que expone a la infección viral a las células de la capa basal. (14)

## OTRAS INFECCIONES DE TRANSMISION SEXUAL

### Antecedentes

*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Trichomona vaginalis* son los 3 principales patógenos de Enfermedades de Transmisión Sexual (Sexual Transmission Diseases, STD). En las mujeres, *C. Trachomatis* ocasiona cervicitis, uretritis, endometritis y salpingitis. Una infección crónica con *C. Trachomatis* puede resultar en cicatrización de las trompas de Falopio, infertilidad y embarazo ectópico. *N. Gonorrhoeae* es el agente causal de la gonorrea y sin tratamiento, puede ocasionar vulvovaginitis y enfermedad inflamatoria pélvica. *T. Vaginalis*, un parásito protozoario, es el agente causal de la tricomoniasis. Una infección con *T. Vaginalis*, puede ocasionar vaginitis, cervicitis y uretritis. Estos tres patógenos también son una causa significativa de leucorrea en las mujeres. (2)

Los Micoplasmas son bacterias pequeñas (0.2 – 0.3 nm), sin pared celular y son organismos intracelulares obligados. Las variedades más comunes que se observan en el tracto genital son *U. Urealyticum*, *M. Hominis* y *M. Genitalium*. Los niños pueden ser colonizados con micoplasmas genitales en el momento del nacimiento. Después de la pubertad, la colonización con micoplasmas ocurre principalmente a través del contacto sexual. Los micoplasmas genitales se aíslan en mujeres embarazadas aproximadamente con la misma frecuencia que en mujeres no embarazadas con la misma frecuencia de actividad sexual. Los micoplasmas y ureaplasmas son fuertemente asociados con infertilidad, infección intraamniótica, infección post-parto, enfermedad inflamatoria pélvica y corioamnionitis histológica. (17)

El estándar actual para las infecciones de transmisión sexual implica el uso de pruebas individuales para la detección de cada uno de los patógenos posibles. La mayoría de las pruebas comerciales se enfocan en la detección de las dos principales bacterias causantes de STI: CT y NG. Sin embargo, ya que la mayoría de las STI no presentan síntomas notables, la



detección de una gama amplia de patógenos es de suma importancia. Una complicación adicional en el diagnóstico de las STI se debe a que diferentes patógenos pueden ocasionar síntomas similares, pero el régimen de tratamiento con antibiótico varía dependiendo del microorganismo causante de la enfermedad. La detección simultánea y precisa en las pruebas de STI es la clave en la resolución de estos problemas y en una atención efectiva y de bajo costo para el paciente. (17)

## **2.1.2 *Ureaplasma parvum***

Es un organismo bacteriano microscópico que vive en las membranas mucosas del cuerpo humano. Es condicionalmente bacteria patógena que es parte de la micro flora se puede encontrar incluso en ensayos humanos sanos. En el estado normal del organismo, este organismo no causa ningún síntoma. Pero a niveles más bajos de protección inmune estas bacterias comienzan a multiplicarse rápidamente, resultando en una serie de complicaciones. (18)

Ureaplasmosis suele atribuir al grupo de las enfermedades de transmisión sexual, ya que la infección se transmite durante el contacto sexual. En cuanto a las rutas nacionales de transmisión, es poco probable. Además, la posible infección del feto de la madre enferma en el útero o durante el paso por el canal del parto. (18)

## **2.1.3 *Ureaplasma urealyticum***

EL *Ureaplasma Urealyticum* es una bacteria que se encuentra presente en los genitales del 70% de los hombres y mujeres. A pesar de transmitirse por contacto sexual, la ureaplasma urealyticum no es técnicamente una enfermedad de transmisión sexual ya que puede no desarrollar una infección. Pueden causar uretritis, infertilidad, abortos o afectar gravemente al feto. Se trata de una infección muy contagiosa que puede propagarse a través de la sangre, la saliva o incluso el aire. Muchas personas son portadoras de esta bacteria sin saberlo ya que no tienen síntomas y no son conscientes de que la pueden estar contagiando. (19)

## **2.1.4 *Chlamydia Trachomatis***

La clamidiasis es una infección bacteriana que se contagia a través del contacto sexual con una persona infectada. La clamidia es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más comunes; más de 50 millones de casos ocurren en el mundo y aproximadamente 3 millones de casos ocurren en los Estados Unidos anualmente. (20)



## **2.1.5 *Mycoplasma hominis***

Los *Mycoplasmas* son patógenos extracelulares que se adhieren a superficies epiteliales celulares. Así, las proteínas de adherencia son uno de los factores de mayor virulencia. La proteína de adherencia en *M. pneumoniae* se ha identificado como una proteína de 168 kD llamada P1. La adhesina P1 se localiza en la punta de las células bacterianas y se une con los residuos de ácido siálico localizados en las células epiteliales del hospedero. (21)

## **2.1.6 *Neisseria gonorrhoeae***

La *Neisseria Gonorrhoeae* o gonococo es una bacteria Gram-negativa, oxidasa positiva, aeróbica, nutricionalmente fastidiosa, que microscópicamente aparece como diplococos. Los humanos son los únicos hospedadores naturales del gonococo, el cual se transmite por vía sexual. (22)

## **2.1.7 *Mycoplasma genitalium***

El *Mycoplasma Genitalium* fue identificado por primera vez en 1980, pero es hasta este año cuando se está expandiendo. De acuerdo con el estudio, la MG es una bacteria que está presente en alrededor del 1% de la población mundial de entre 16 a 44 años. Científicos británicos la descubrieron y se está dispersando rápidamente entre hombres y mujeres, advierte un estudio publicado en el Journal of Epidemiology. El *Mycoplasma genitalium* (MG) puede producir en las mujeres dolor pélvico y sangrado después del sexo. Se puede localizar en la vagina, el cuello uterino y el endometrio. Se estudia si la nueva enfermedad de transmisión sexual juega un papel importante en la infertilidad y el embarazo ectópico. (23)

## **2.1.8 *Trichomona vaginalis***

*Trichomonas Vaginalis* es un protozoo unicelular flagelado, actualmente incluido en el phylum Parabasalia, un grupo de organismos flagelados microaerófilos. Se le ubica en el tracto urogenital del humano. *Trichomonas Tenax* y *Pentatrichomonas Hominis* se han asociado a patología bucal y respiratoria, e intestinal, respectivamente. *T. vaginalis* es el agente no viral más frecuente como causa de infecciones de transmisión sexual. (24)



## **Factores de riesgo**

### **Inicio de una vida sexual a edades tempranas**

El inicio de vida sexual a una edad temprana, representa uno de los principales riesgos, ya que en esta época de vida la motivación de pertenecer a un grupo social originan conductas riesgosas, conjugado con la falta de protección y la posibilidad de que las parejas pudieran estar infectadas aumentan los riesgos de infecciones de transmisión sexual.(25)

Al tener vida sexual activa antes de los 20 años tienen mayor actividad sexual y más tiempo de exposición y mayor probabilidad de tener contacto con diferentes tipos de virus del papiloma. (25)

### **Promiscuidad**

Según un estudio analítico descriptivo y retrospectivo con una muestra de 70 adolescentes que presentaron infección del VPH, se obtuvieron datos que demuestran que el 72.9% de jóvenes afirmaron haber tenido dos o más parejas sexuales, se confirma con otro estudio realizado en EE. UU. Donde se encontró que los jóvenes con dos o más parejas sexuales son más propensos de contagiarse del virus del papiloma humano. (25)

### **Falta o uso inadecuado del preservativo**

El uso incorrecto del preservativo o la falta del mismo en todo tipo de relaciones sexuales predisponen al contagio del virus del papiloma humano y otras infecciones de transmisión sexual.

Especialmente el condón femenino no se ha tomado en consideración para estar en el cuadro básico de métodos anticonceptivos por ser más costoso, este permite aminorar los riesgos de contraer VPH porque cubre más área genital y puede brindar una mejor protección que el condón masculino, sin impedir al 100% el contagio del virus en áreas sin protección y laceradas.

### **Higiene**

La falta de higiene es otro factor de riesgo para la prevalencia de toda clase de infecciones a causa de la retención de esmegma y fimosis, que causan el acumulo de bacterias y virus en



condiciones de irritación crónica lo que fácilmente puede albergar cualquier agente patógeno e incrustarse por medio de la lesión. (25)

La higiene de los genitales disminuye la proliferación de bacterias y virus en el área, en las que las bacterias siempre están presentes, por ello es necesario tener hábitos de higiene adecuados que disminuyan la probabilidad de infecciones genitales. (25)

## **Alcoholismo, tabaquismo, drogadicción y abuso de medicamentos**

El hábito de fumar, tomar bebidas alcohólicas causa un efecto que favorece la infección de VPH. El efecto nocivo por abuso en el consumo de alcohol que produce determinadas sustancias que actúan como oxidantes, elementos cuya acción constituye un mecanismo importante en la inducción de transformaciones malignas celulares. (25)

El hábito de fumar presenta un efecto nocivo especialmente en las secreciones vaginales, sobre todo en el epitelio del canal endocervical que es reservorio del virus del papiloma humano, generando la inoculación con mayor facilidad en ambiente óptimo para su propagación. (25)

El uso de medicamentos y consumo de drogas provoca la depresión del sistema inmunológico lo que predispone al desarrollo de cáncer anogenital y del cuello uterino, además otros factores que juegan un papel en la progresión de la infección es la susceptibilidad individual. (25)

## **Inmunidad**

Los diversos factores genéticos y efectos colaterales de coinfecciones simultáneas como de otras enfermedades de transmisión sexual, que son agentes aceleradores de los efectos del VPH tales como el virus de inmunodeficiencia, virus del herpes simple tipo 2 y *Chlamydia trachomatis*. (25)

Otro riesgo es provocado por el uso prolongado de anticonceptivos, el cual se vincula con infecciones provocadas por el virus, lo mismo sucede con la alteración hormonal. Algunos estudios estiman que las mujeres que utilizan anticonceptivos por más de cinco años duplican el riesgo de contraer cáncer cervicouterino por el exceso de hormonas. (25)





## **Alimentación**

La dieta baja en antioxidantes, ácido fólico y vitamina C, favorece la persistencia de la infección y la evolución de lesiones intraepiteliales cervicales de primero, segundo y tercer grado, inclusive del cáncer cervicouterino (25)

Una óptima alimentación ayuda a mantener las células en buenas condiciones de modo que no permite el acceso de ningún microorganismo patógeno, se recomienda una alimentación rica en frutas y verduras, la nutrición equilibrada en antioxidantes ayuda a reducir la probabilidad de infectarse. (25)

Existen circunstancias que aceleran el proceso de oxidación, entre ellas fumar, la contaminación ambiental, los rayos ultravioleta y los alimentos con alto contenido de grasas, sales y conservadores. (25)

## **Pobreza**

La gran mayoría de la población se encuentra en situación de pobreza, donde se encuentra en una discriminación social especialmente por la falta de servicios públicos, entre los que se encuentran la falta de atención médica, además de no contar con un nivel de educación superior, una vivienda digna, un empleo con prestaciones, siendo la más vulnerable y propensa a enfermar a causa de la situación en la que vive y la falta de oportunidades, dejando más expuestos a los adolescentes ante las enfermedades. (25)

## **2.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA qPCR**

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una técnica que puede detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de secuencias específicas de ácidos nucleicos de microorganismos, esta técnica es usada tanto en el ámbito de investigación como en el diagnóstico clínico ya que puede adentrarse en cambios tanto proteicos y funcionales así como medir cargas virales o bacterianas. (27)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una técnica con la que se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. (26)



Esta técnica se basa en la implementación de sondas marcadas con fluoróforos, las sondas de hidrólisis son básicamente oligonucleótidos fluoróforos en ambos extremos que presentan una secuencia complementaria aparte del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Uno de los fluoróforos actúa como donador fluorescente en el extremo 5' y el otro como aceptor de fluorescencia en el extremo 3' (27)

La ADN polimerasa se desplaza sobre la cadena de ADN sintetizando la cadena complementaria a partir de un fragmento de ADN que sirve de molde (cebador). Al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado, la hidroliza. El fluorocromo del extremo 5' de la sonda (el donador) es liberado. El fluorocromo aceptor no puede entonces absorber la fluorescencia del donador por estar alejado de él espacialmente. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN presente, y la representa gráficamente. (27)

La gran complejidad de los procesos biológicos en los seres vivos ha sido por años la razón por la que los investigadores han centrado su atención en descifrar los mecanismos que se esconden detrás de esos procesos. Desde las primeras observaciones de Gregorio Mendel hasta la actualidad, se tiene la noción de que parte de la explicación de los diferentes fenómenos biológicos se encuentra escondida en lo más recóndito del genoma celular y que una de las claves para entender dichos fenómenos es el estudio de los genes. Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos fue el de Watson y Crick, al descifrar la estructura del ADN (ácido desoxirribonucleico). (27)

Desde entonces, varios grupos han mostrado un gran interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que les permitan estandarizar protocolos experimentales para estudiar los ácidos nucleicos. Es así como han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del ADN; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por Kary Mullis y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento. (27)

Actualmente se sabe que la misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima



conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines. (27)

El desarrollo de esta técnica permitió estudiar y manipular mejor al ADN, facilitando el establecimiento de protocolos experimentales en biología molecular. El progreso de esta técnica ha sido muy notable y ha ido en paralelo con los nuevos retos para estudiar y comprender mejor el rol de los genes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Es por ello que una de las formas recientes para detectar y cuantificar a los ácidos nucleicos es a través de la PCR en tiempo real, la cual es una modalidad de la PCR considerada como una técnica cuantitativa. (28)

Hoy en día, la PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, formando parte del quehacer científico de muchos laboratorios de investigación que la utilizan principalmente para expresión génica, genotificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones. En esta revisión se hace una descripción de los fundamentos de la PCR convencional o también conocida como punto final; además se explica qué se necesita para que la reacción sea exitosa, cómo se lleva a cabo y cómo se analizan los resultados. Finalmente, introducimos al lector a la PCR en tiempo real con la finalidad de que comprenda las diferencias básicas con la PCR punto final. (28)

## **2.4 Reacción en Cadena de la polimerasa qPCR aplicado al diagnóstico de microorganismos de Transmisión sexual**

### **2.4.1 Anyplex™ II STI-7**

Permite la detección e identificación de 7 principales patógenos causantes de ITS - *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Ureaplasma urealyticum* (UU), y *Ureaplasma parvum* (UP) en una sola reacción de PCR en tiempo real. Este ensayo se basa en la tecnología probada de RPD™ Seegene y su tecnología TOCE™ desarrollado recientemente. La mayoría de las ITS (infecciones de transmisión sexual) son asintomáticas y algunos tienen altas tasas de prevalencia. Si no se trata, pueden convertirse en una causa importante de enfermedades tales como PID (enfermedad inflamatoria pélvica), embarazo extrauterino, infertilidad, dolor pélvico crónico, cervicitis y uretritis. Anyplex™ II STI-7 Detección es una prueba que no sólo



impide aún más la transmisión de enfermedades de transmisión sexual, pero también facilita tratamientos eficaces de ITS, ya que detecta e identifica los 7 principales patógenos causantes de ITS dentro de 3 horas y 20 minutos después de la extracción de ADN. (17)

## **Características**

Detección de 7 principales patógenos causantes de infecciones de transmisión sexual en una sola reacción.

PCR en tiempo real Multiplex mediante la aplicación de tecnología de DPO™ y TOCE™

El análisis cuantitativo por el método cíclico-CMTA

Susceptibles de manipulación de la muestra automática y el control del sistema de ensayo

Sistema de UDG para eliminar y prevenir traspaso de la contaminación

Total Control de Procesos

Análisis de resultados y la interpretación conveniente proporcionada por Seegene Visor.

## **PRINCIPIOS Y DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO**

### **Principios**

La prueba de detección STI-7 de Anyplex™ II es representativa de la tecnología de Seegene y está basada en la nueva tecnología TOCE™, la cual permite detectar múltiples patógenos en un solo canal de fluorescencia en los instrumentos para PCR en tiempo real. (17)

En los ensayos de curvas de disociación actuales, se observan con frecuencia diferencias de temperatura entre los ADN que muestran una gran variación en sus secuencias, lo que resulta problemático en el área de diagnóstico clínico, donde es crítica la exactitud y reproducibilidad de las pruebas. No obstante, la tecnología TOCE™ está diseñada para no verse afectada por variaciones en la secuencia, por lo tanto, garantiza valores de Tm consistentes. (17)

La prueba de detección STI-7 de Anyplex™ II representa una nueva clase de prueba molecular por CMTA-cíclico que es un multiplexado. Este método puede discriminar más patógenos en muestras co-infectadas. El Anyplex™ II es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real que

permite la amplificación, detección y diferenciación simultánea del material genético de *C. trachomatis* (CT), *N. gonorrhoeae* (NG), *M. genitalium* (MG), *M. hominis* (MH), *U. urealyticum* (UU), *U. parvum* (UP), *T. vaginalis* (TV) y el Control Interno (Internal Control, IC). La eficiencia en un ensayo de PCR se ve reducida por inhibidores que pueden estar presentes en las muestras clínicas. Debido a lo anterior, se ha incorporado un control interno (IC) al producto para que funcione como un control exógeno global con el fin de monitorear el proceso de aislamiento de ácidos nucleicos y para verificar una posible inhibición de la PCR. El control interno es co-amplificado junto al material genético de las muestras clínicas. (17)

Además, se utiliza el Uracil-DNA glicosilasa (UDG) para evitar la mutagénesis por eliminación del uracil de las moléculas de ADN por escisión del N-glicosilico unido e inicia la vía de reparación por escisión de base (VER). Este sistema es usado para el control de la contaminación cruzada de la muestra con amplicones. (17)

## **Procedimiento**

Muestra (Orina, hisopados uretrales, vaginales y citologías en base)

Aislamiento de ácidos nucleicos (extracción de ADN)

Amplificación y detección mediante el Sistema Anyplex TM II

Análisis de Resultados

## **MANEJO Y ALMACENAMIENTO**

Los componentes de Anyplex TM II STI-7 Detection, deben almacenarse a -20° C. Todos los componentes son estables hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. El congelamiento y descongelamiento repetido debe evitarse ya que podría reducir la sensibilidad. Si los reactivos serán usados de manera intermitente, deberán almacenarse en alícuotas. (17)

### **2.4.2 Anyplex II Detección HPV 28**

Representa las tecnologías patentadas de Seegene, principalmente la tecnología TOCETM recientemente desarrollada, la cual hace posible detectar múltiples patógena en un solo canal fluorescente de un equipo para PCR en tiempo real. En el actual análisis de las curvas de fusión



se observan a menudo diferencias de temperatura entre ADNs que tienen alta variación de la secuencia, resultando así un problema en el campo del diagnóstico clínico donde los resultados precisos y reproducibles son críticos. Sin embargo la tecnología TOCE está diseñada para que no sea afectada por las variaciones en la secuencia, por lo tanto garantizar consistentes valores de la temperatura de melting. (29)

El Anyplex II Detección de HPV28 es una prueba multiplex en PCR de tiempo real, que permite la amplificación simultánea, detección y diferenciación de ácidos nucleicos diana de diversos virus del papiloma humano (VPH), tales como 19 tipos de alto riesgo del VPH (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) y 9 tipos de bajo riesgo del VPH (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70), así como el control interno (IC). (29)

En la PCR, la eficacia puede ser reducida por los inhibidores que pueden estar presentes en las muestras clínicas. Un control interno (IC) se incorpora en el producto como un proceso endógeno

Con el fin de controlar el aislamiento de ácido nucleico, y para verificar la posible inhibición de la PCR. El Control interno (IC) es co-amplificado con los ácidos nucleicos objetivo dentro de las muestras clínicas. El II Kit Anyplex II Detección de HPV28 utiliza los genes de la beta globina humana (HBB) como un control interno endógeno que puede asegurar la purificación de ADN, y la verificación de la reacción de PCR. (29)

El sistema uracil-ADN glicosilasa (UDG) se emplea en el kit Anyplex II HPV28.

La función de UDG es evitar la mutagénesis por eliminación de uracilo de moléculas de ADN mediante la escisión del enlace N-glycosílico e iniciando la vía de reparación de base por escisión (BER). Por lo tanto, el sistema UDG se utiliza para el control de la contaminación cruzada de las muestras con amplicones. (29)

## **Procedimiento**

Muestras de líquido basados en la citología y muestra de escobillón cervical.

Aislamiento del ácido nucleico

Ácido nucleico



Amplificación y detección usando el sistema Anyplex™ II

Análisis de resultados

## **ALMACENAMIENTO Y MANEJO**

Los componentes del kit de detección Anyplex II HPV28 deben almacenarse a -20 °C. Todos los componentes son estables en condiciones de almacenamiento recomendadas hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta. Se debe evitar la descongelación y congelación, ya que esto puede reducir la sensibilidad. Si los reactivos se van a utilizar en forma intermitente, deben ser congelados en alícuotas. (29)



## CAPITULO III

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Diagnosticar enfermedades de transmisión sexual mediante PCR Tiempo Real en mujeres indígenas del Ecuador 2016 - 2017.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la incidencia de virus del papiloma humano, *Clamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*, en mujeres indígenas de etnias Kychwa y Shuar del Ecuador pertenecientes a las provincias de Loja, Morona Santiago y Cañar.
- Descripción de la técnica Reacción en cadena de la Polimerasa empleada para el Diagnóstico.
- Describir datos sociodemográficos de las mujeres que se realizan el diagnóstico de infecciones de transmisión sexual.





## CAPITULO IV

### 4. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo donde se examina la relación existente entre la presencia de un microorganismo y una serie de variables en una población determinada, así como la descripción de los procedimientos realizados en el laboratorio de biología molecular encaminada al diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual.

#### 4.2 AREA DE ESTUDIO

Muestras cervicouterina obtenidas en la población indígena Kychwa y Shuar de las provincias de Cañar Comunidad Quilloac, Loja Cantón Saraguro, Morona Santiago Cantón Sevilla Don Bosco.

#### 4.3 UNIVERSO Y MUESTRA

##### Universo

Constituyen todas las mujeres pertenecientes a los pueblos indígenas Kychwa, Saraguro y Shuar, que acuden a los hospitales del Ministerio de Salud Pública de Cañar, Saraguro y Macas.

##### Muestra

Para el cálculo del tamaño de la muestra se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

Tamaño de la población kychwa y Shuar 970.321

Frecuencia esperada de la infección por VPH 30%

Límite de confianza 5%

Tamaño de la muestra 323 mujeres

La muestra se calculó con la siguiente fórmula  $n = p \cdot (1-p) \cdot (Z\alpha/d)^2$ .

Dónde:

d = distancia (o tolerancia) que deseamos obtener con respecto a la proporción 0,05



$p$  = proporción del problema que interesa 0,30

$Z_{\alpha} = 1,96$

Se trata de una muestra no probabilística en razón de que las poblaciones indígenas son muy dispersas.

## 4.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

### Criterios de Inclusión

Mujeres en edad fértil comprendidas entre 15 y 45 años de edad.

Mujeres consideradas de nacionalidades indígenas SHUAR, KANARY, SARAGURO

No presentar sangrados vaginales

Abstinencia sexual de la participante tres días.

Mujeres que hayan firmado en consentimiento informado, en caso de menores de edad el asentimiento.

### Criterios de exclusión

Mujeres no consideradas de nacionalidades indígenas SHUAR, KANARY, SARAGURO.

Mujeres que no hayan firmado el consentimiento informado y menores de edad cuyo representante no haya firmado el asentimiento informado.

Mujeres Embarazadas.

## 4.5 VARIABLES

Las variables y su Operacionalización se visualizarán en el anexo 1

## 4.6 MÉTODOS TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

### MÉTODO

Se llevó a cabo un estudio molecular con 398 pacientes (Mujeres de nacionalidades indígenas Kychwa y Shuar) con la finalidad de determinar genes presentes en microorganismos de transmisión sexual.



## **TÉCNICAS**

Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real

## **INSTRUMENTO**

Se utilizaron equipamientos e infraestructura del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cuenca Facultad de ciencias médicas la misma que consta de:

Thermal Cyclor BIO-RAD

Cámara de Flujo Laminar TELSTAR

Centrifuga LABNET

TERMOINCUBADOR LABNET

Pipetas automáticas LABNET

Vortex VORTEXMIXER

Kit HPV- 28 Anyplex

Kit ITS-7 Anyplex

QIAamp DNA

## **4.7 PROCEDIMIENTOS**

### **LABORATORIO**

Fase Pre analítica

- Recepción de Muestras y Formularios
- Verificación y validación de formularios y datos de la Paciente con la ayuda de la página web:

<https://servicios.registrocivil.gob.ec/cdd/>



Para confirmación de datos, como el nombre y número de cédula.

- Verificación y codificación de la Muestra (Cervico uterina) VIAL.
- Preparación de muestras y verificación datos correspondientes a cada paciente previo a la fase analítica.

## Fase Analítica

- Extracción de ADN (Tiempo requerido para procesar 5 muestras 40min.)
  1. Mix 200ul de muestra, 20ul de proteinasa K, 200ul buffer AL. Vortex.
  2. Incubar por 10minutos a 56°C
  3. Agregar 200ul de etanol al 90% (4°C). Vortex.
  4. Pasar el total del contenido a la columna, centrifugar 1 minuto a 8000 rpm.
  5. Agregar 500ul de buffer AW1y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm.
  6. Agregar 500ul de buffer AW2y centrifugar por 3 minuto a 14000 rpm.
  7. Trasladar la columna a un último tubo y agregar 150ul de buffer AE, incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm.
  8. Identificar tubo con DNA, conservar a 4°C.
- PCR en tiempo Real. HPV-28

Tiempo requerido para procesar 24 muestras 4 horas, 20 min.

1. Encender el equipo para posterior conexión con el computador.
2. Clic Bio-Rad CFX.
3. Open new experimento, se abre nueva ventana.
4. Protocol – ya existente – busco carpeta BIORAD QPCR 2014 y guardar en New carpeta



5. Plate- Create new- select fluorophores: FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, Quasar 705.
6. Sample type: Unknown indica que se debe señalar doble recuadro Control + clic.
7. Señalar fluorophores y damos nombre a cada recuadro (A,B)
8. Load – para grabar el nombre dado a cada recuadro. Lisa la bandeja.
9. Montamos las muestras en el equipo. Start Run- clic para iniciar. (A espera hasta preparar mix)

PCR- Real Time.-

Master Mix: depende del No. De muestras (5ul de cada reactivo para 1 muestra; no olvidar NC, PC1, PC2, PC3)

1. En un tubo de 1,5 ml colocara:
2. HPV 28. Tom A/ Tom B.
3. Wáter libre de ARNasas
4. PCR Master Mix
5. En los microtubos de color blancos colocar 15ul de PCR Mastermix
6. Agregar 5ul de muestra, NC, PC1, PC2, PC3
7. Una vez listo colocar los microtubos con mix y muestra en el equipo e iniciar corrida Start Run.

Después de la corrida

1. Clic en fluorophores y desmarco: FAM, HEX, Cal Red 610, Cal Red 670, Quasar 705.
2. Dejamos solo marcado Quasar 670 para luego proceder a marcar en CERO.
3. Marcar nuevamente los fluorophores.
4. Tools. Seegene export. Se abre lista de carpetas y busco, selecciono y guardo.



5. Para visualización de resultados abrir programa SEEGENE VIEWER, busco y abro CARPETA No.1 para visualizar los resultados e INTERPRETAR.

- PCR en tiempo Real. ITS-7

Tiempo requerido para procesar 40 muestras 4 horas y 30 min.

1. Encender el equipo para posterior conexión con el computador.
2. Clic Bio-Rad CFX.
3. Open new experimento, se abre nueva ventana.
4. Protocol – ya existente – ITS-7 protocolo
5. Plate- Create new- select fluorophores: FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 705.
6. Sample type: Unknown indica que se debe señalar doble recuadro Control + clic.
7. Señalar fluorophores y damos nombre a cada recuadro.
8. Load – para grabar el nombre dado a cada recuadro. Lisa la bandeja.
9. Montamos las muestras en el equipo. Start Run- clic para iniciar. (A espera hasta preparar el mix)

PCR- Real Time.-

Master Mix: depende del Número de muestras a procesar (10ul de cada reactivo para 1 muestra; no olvidar NC, PC1, PC2, PC3)

1. En un tubo de eppendorf de 1,5 ml se colocará:
2. 4x STI tom
3. RNase Free water
4. Anyplex PCR máster mix
5. En los microtubos de color blancos colocar 15ul de PCR Mastermix



6. Agregar 5 ul de muestra previamente colocada 5ul del Control interno
7. Una vez listo colocar los microtubos con mix y muestra en el equipo e iniciar corrida Start Run.

Después de la corrida

1. Clic en fluorophores y desmarco: FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 705.
2. Se deja solamente marcado Quasar 670 para bajar a cero la línea de control
3. Marcar nuevamente los fluorocromos.
4. Tools. Seegene export. Se abre lista de carpetas y busco, selecciono y guardo.
5. Para visualización de resultados abrir programa SEEGENE VIEWER, busco y abro CARPETA No.1 para visualizar los resultados e INTERPRETAR.

Fase Post analítica

Resultados obtenidos en el procesamiento de la Reacción en cadena de la polimerasa PCR Real time. HPV -28; ITS-7

Verificación y validación de resultados.

Reporte de controles internos.

Generación de hoja de resultados; los mismos que cuentan con datos personales de la paciente provistos en los formularios, y resultados de la PCR Real time.

## **4.8 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS**

Los resultados emitidos por el equipo BIORAD PCR real time, serán analizados por programas informáticos "SEEGENE", que posteriormente serán enviados al software SPSS 23 para el análisis de datos estadísticos obtenidos en el procesamiento de las muestras cervicouterina.



## 4.9 ASPECTOS ÉTICOS

En conjunto con el Proyecto, esta investigación se realizará aplicando los principios de la Declaración de Helsinki (adoptada por la 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013), las leyes y reglamentos del país, que sustentan la mayor protección al individuo.

Para cumplir con tales propósitos se procedió a recibir el visto bueno por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca; en este marco, previo a la recolección de los datos, las participantes firmaron el consentimiento informado o colocar su huella digital. Para esto, a los líderes y demás miembros de la comunidad se les informó acerca de los objetivos del estudio, tiempo de duración de las entrevistas, las preguntas que se les realizó, las grabaciones de las entrevistas, detalles de los exámenes médicos y de laboratorio, la confidencialidad de la información, la libertad de retirarse de la investigación en el momento que considere pertinente y que por esta situación no vieron afectado su situación personal, familiar ni laboral; además se les informó que por su participación no recibirían ningún incentivo económico ni de otra índole. Dadas las características de la investigación, no existió ningún riesgo de daño físico, psicológico o de otra naturaleza para los participantes.



## CAPÍTULO V

### 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### Descripción de la muestra

Se procesaron un total de 396 muestras cervicouterina, recolectadas por el grupo de investigadores del proyecto “Diseño de un programa de promoción de salud sexual y reproductiva y de prevención de VPH y de enfermedades de transmisión sexual para mujeres de Pueblos y Nacionalidades Indígenas KYCHWA y SHUAR del Ecuador, año 2015-2017” procedentes de comunidades de la Provincias de Cañar, Loja y Morona Santiago.

#### Tabla N°1

Distribución de 398 mujeres de etnia Kychwa y Shuar de las comunidades de Quilloac, Saraguro y Sevilla Don Bosco según sus características demográficas y socioeconómicas.

| Provincia de residencia                                    | No  | %     |
|--|-----|-------|
| Saraguro   | 120 | 30,30 |
| Cañar  | 131 | 33,08 |
| Macas  | 145 | 36,62 |
| TOTAL  | 396 | 100   |
| <b>Edad</b>  |     |       |
| < 20   | 33  | 8,33  |
| 20 a 39  | 293 | 73,99 |
| 40 y más   | 70  | 17,68 |
| TOTAL  | 396 | 100   |
| <b>Etnia</b>   |     |       |
| Kañari   | 131 | 33,08 |
| Saraguro   | 120 | 30,30 |
| Shuar  | 145 | 36,62 |
| TOTAL  | 396 | 100   |
| <b>Estado Civil</b>  |     |       |
| Soltera  | 70  | 17,68 |
| Casada   | 169 | 42,68 |
| Viuda  | 9   | 2,27  |
| Divorciada   | 6   | 1,52  |
| Unión libre  | 142 | 35,86 |
| TOTAL  | 396 | 100   |
| <b>Ocupación</b>   |     |       |
| Personal directivo de Administración pública y de empresas | 11  | 2,78  |
| Profesionales intelectuales                                | 15  | 3,79  |
| Técnicos y profesionales de nivel medio                    | 14  | 3,54  |

|   |     |       |
|---|-----|-------|
| Empleados de oficina                          | 13  | 3,28  |
| Comerciantes                                  | 20  | 5,05  |
| Trabajador calificado agropecuario y pesquero | 45  | 11,36 |
| Oficiales operarios y artesanos               | 58  | 14,65 |
| Operadores de instalaciones y maquinas        | 11  | 2,78  |
| Trabajadores no calificados                   | 173 | 43,69 |
| Fuerzas Armadas                               | 1   | 0,25  |
| Desocupados                                   | 28  | 7,07  |
| Inactivos                                     | 7   | 1,77  |
| TOTAL   | 396 | 100   |
| <b>Nivel de instrucción</b>                   |     |       |
| Ninguno                                       | 5   | 1,26  |
| Centro de alfabetización                      | 13  | 3,28  |
| Primaria                                      | 152 | 38,38 |
| Secundaria                                    | 185 | 46,72 |
| Tercer nivel                                  | 31  | 7,83  |
| Cuarto Nivel                                  | 8   | 2,02  |
| No contesta                                   | 2   | 0,51  |
| TOTAL   | 396 | 100   |

**Fuente:** Base de datos

**Elaboración:** Los autores

En virtud a la población en estudio, se determinó que el 33.08%, corresponde a muestras cervicouterina obtenidas de mujeres de etnia kañari que radican en la comunidad de Quilloac, seguida de un 30.30% pertenecientes a mujeres de etnia Kychwa Saraguro de la provincia de Loja; finalmente un 36.62% de muestras fueron obtenidas de mujeres de etnia Shuar del cantón Sevilla Don Bosco.

Las mujeres cuyas edades oscilan entre los 20 a 39 años representan un 73.99%, siendo las que más participaron en el proyecto de investigación, seguida de un 17.68% (70/396) de mujeres cuyas edades sobrepasan los 40 años y un pequeño porcentaje del 8.33 % (33/396) representada por mujeres menores a 20 años de edad.

Un considerable número de mujeres a las que se les realizó el examen de la Reacción en cadena de la polimerasa son casadas representando un 42.68% suponiendo un grupo con vida sexual activa, seguido de un 35.86% de mujeres que viven en unión libre, un 17.68% de mujeres solteras, un 2.27% de mujeres viudas y un 1.52% de mujeres que según indican los formularios están divorciadas.



En cuanto a las actividades ocupacionales que realizan un 43.69% de mujeres refieren ser trabajadores no calificados, cuyo nivel de ingreso impide que las mismas puedan costearse exámenes biomoleculares que suponen un costo alto.

El nivel de educación determinado en el estudio brindan datos en los que se evidencia un 46.72% de mujeres que han culminado la secundaria, seguida de un 7.83% que decidieron culminar el tercer nivel de educación y un 2.02% que alcanzaron títulos de cuarto nivel, sin embargo un considerable número de mujeres representando un 38.38% refieren haber culminado únicamente la primaria seguida de un 3.28% cuyo nivel de educación alcanza únicamente centros de alfabetización y un 1.26% que no han tenido niveles de instrucción consideradas analfabetas.

## Tabla N°2

Diagnóstico de genotipos de alto y bajo riesgo del virus del papiloma humano identificado en las 398 mujeres de etnia Kychwa y Shuar de las comunidades de Quilloac, Saraguro y Sevilla Don Bosco.

| Genotipos de alto riesgo | Frecuencia | Porcentaje | Genotipos de bajo riesgo | Frecuencia | Porcentaje |
|--------------------------|------------|------------|--------------------------|------------|------------|
| No                       | 302        | 76,3       | No                       | 355        | 89,6       |
| Si                       | 94         | 23,7       | Si                       | 41         | 10,4       |
| Total                    | 396        | 100,0      | Total                    | 396        | 100,0      |

**Fuente:** Base de datos

**Elaboración:** Los Autores

Datos obtenidos en el laboratorio de biología Molecular de la Universidad de Cuenca determinan un 23.7% (94/396) de mujeres de nacionalidades indígenas del sur del Ecuador presentan genes de alto riesgo del VPH, cuya correlación con lesiones cervicales se evidenciarán en el proyecto “Diseño de un programa de promoción de salud sexual y reproductiva y de prevención de VPH y de enfermedades de transmisión sexual para mujeres de Pueblos y Nacionalidades Indígenas KYCHWA y SHUAR del Ecuador, año 2015-2017”.

Seguida de un 10.4% (41/396) de mujeres que fueron diagnosticadas con genes de bajo riesgo.

## Tabla N°3

Incidencia de genotipos de alto y bajo riesgo en mujeres de nacionalidades indígenas del sur del Ecuador.

| VPH positivo  |           | N°          | %           |
|---------------|-----------|-------------|-------------|
| Si            |           | 135         | 34,09       |
| No            |           | 261         | 65,91       |
| Genotipos     | No        | %           | Incidencia  |
| <b>GAL 16</b> | <b>10</b> | <b>5,85</b> | <b>2,53</b> |
| <b>GAL 18</b> | <b>3</b>  | <b>1,75</b> | <b>0,76</b> |
| <b>GAL 26</b> | <b>2</b>  | <b>1,17</b> | <b>0,51</b> |
| <b>GAL 31</b> | <b>10</b> | <b>5,85</b> | <b>2,53</b> |
| <b>GAL 33</b> | <b>1</b>  | <b>0,58</b> | <b>0,25</b> |
| <b>GAL 35</b> | <b>1</b>  | <b>0,58</b> | <b>0,25</b> |
| <b>GAL 39</b> | <b>15</b> | <b>8,77</b> | <b>3,79</b> |
| <b>GAL 45</b> | <b>3</b>  | <b>1,75</b> | <b>0,76</b> |
| <b>GAL 51</b> | <b>5</b>  | <b>2,92</b> | <b>1,26</b> |
| <b>GAL 52</b> | <b>6</b>  | <b>3,51</b> | <b>1,52</b> |
| <b>GAL 53</b> | <b>8</b>  | <b>4,68</b> | <b>2,02</b> |
| <b>GAL 56</b> | <b>2</b>  | <b>1,17</b> | <b>0,51</b> |
| <b>GAL 58</b> | <b>17</b> | <b>9,94</b> | <b>4,29</b> |
| <b>GAL 59</b> | <b>16</b> | <b>9,36</b> | <b>4,04</b> |
| <b>GAL 66</b> | <b>9</b>  | <b>5,26</b> | <b>2,27</b> |
| <b>GAL 68</b> | <b>9</b>  | <b>5,26</b> | <b>2,27</b> |
| <b>GAL 69</b> | <b>3</b>  | <b>1,75</b> | <b>0,76</b> |
| <b>GAL 73</b> | <b>0</b>  | <b>0</b>    | <b>0</b>    |
| <b>GAL 82</b> | <b>5</b>  | <b>2,92</b> | <b>1,26</b> |
| <b>GBR 6</b>  | <b>6</b>  | <b>3,51</b> | <b>1,52</b> |
| <b>GBR 11</b> | <b>2</b>  | <b>1,17</b> | <b>0,51</b> |
| <b>GBR 40</b> | <b>1</b>  | <b>0,58</b> | <b>0,25</b> |
| <b>GBR 42</b> | <b>11</b> | <b>6,43</b> | <b>2,78</b> |
| <b>GBR 43</b> | <b>4</b>  | <b>2,34</b> | <b>1,01</b> |
| <b>GBR 44</b> | <b>2</b>  | <b>1,17</b> | <b>0,51</b> |
| <b>GBR 54</b> | <b>9</b>  | <b>5,26</b> | <b>2,27</b> |
| <b>GBR 61</b> | <b>6</b>  | <b>3,51</b> | <b>1,52</b> |
| <b>GBR 70</b> | <b>5</b>  | <b>2,92</b> | <b>1,26</b> |

**Fuente:** Base de datos

**Elaboración:** Los Autores

De acuerdo a los datos obtenidos en el laboratorio encontramos una incidencia del 34.09% del VPH encontradas en muestras cervicouterina de mujeres de nacionalidades indígenas del sur del Ecuador.

De acuerdo a genotipos de alto riesgo oncogénico se evidencio un 9.94% que hace referencia al genotipo 58; 9.36% genotipo 59; 8.77% genotipo 39; 5.85% genotipos 16 y 31; 5.26% genotipos 66 y 68; 4.68% genotipo 53; 3.51% genotipo 52; 2.92% genotipo 51 y 82; 1.75% genotipos 18, 45 y 69; 1.17% genotipos 26 y 56; 0.58% genotipos 33 y 35; seguido de genotipos de bajo riesgo oncogénico en las cuales se evidencio; 6.43% genotipo 42; 5.26% genotipo 54; 3.51% genotipo 61 y 6; 2.92% genotipo 70; 2.34% genotipo 43; 1.17% genotipo 44 y un 0.58% del genotipo 40. Siendo estos los resultados emitidos en el laboratorio de biología molecular pudiendo ser evidenciados en los anexos.

**Tabla N°4**

Incidencia de infecciones de transmisión sexual en mujeres kychwa y Shuar. Zona 6 - Ecuador, 2016.

| ITS-7                     | No  | %      | Incidencia |
|---------------------------|-----|--------|------------|
| Chlamydia trachomatis CT  | 16  | 4,42   | 4,04       |
| Neisseria gonorrhoeae NG  | 3   | 0,83   | 0,76       |
| Trichomonas vaginalis TV  | 15  | 4,14   | 3,79       |
| Mycoplasma hominis MH     | 82  | 22,65  | 20,71      |
| Mycoplasma genitalium MG  | 2   | 0,55   | 0,51       |
| Ureaplasma urealyticum UU | 62  | 17,13  | 15,66      |
| Ureaplasma parvum UP      | 182 | 50,28  | 45,96      |
| Muestras con ITS          | 362 | 100,00 |            |
| Total de muestras         | 396 |        |            |

**Fuente:** Base de datos

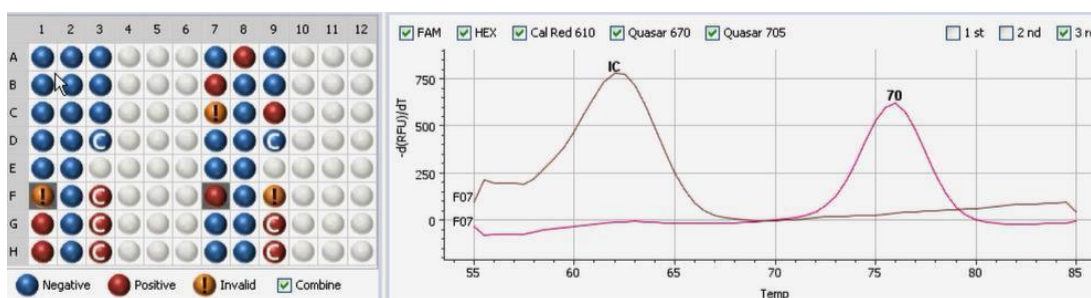
**Elaboración:** Los Autores

En cuanto a microorganismo relacionados con infecciones de transmisión sexual se evidencio un mayor caso de Ureaplasma parvum siendo este un 50.28% (182/396) de mujeres diagnosticadas con este microorganismo seguido de un 22,65% de portadoras de Mycoplasma hominis MH; 17.13% de portadoras de Ureaplasma urealyticum UU; 4.42% de portadoras de

*Chlamydia trachomatis* CT; 4.14% de portadoras de *Trichomonas vaginalis* TV; 0.83% de portadoras de *Neisseria gonorrhoeae* NG y un 0.55% de *Mycoplasma genitalium* MG. Microorganismos diagnosticados por la técnica de biología molecular PCR real time en el laboratorio de biología molecular de la Universidad de Cuenca.

## GRAFICO N°1

Descripción de control de calidad utilizado en el análisis de genotipos del VPH, mediante PCR real time.



Fuente: Base de datos

Elaboración: Los Autores

En el gráfico emitido por el software seegene se evidencia la presencia del control interno brindado por la casa comercial con la finalidad de garantizar el diagnóstico del genotipo del VPH, así como la presencia del gen 70 del virus del HPV, la prueba quedará validada siempre y cuando exista la presencia del control interno (CI) caso contrario será invalidada y se procederá nuevamente con el análisis desde la extracción del ADN. En el gráfico podemos evidenciar así también controles positivos marcados con rojo (C), las mismas que hacen referencia a tres controles positivos con diferentes cadenas de nucleótidos de genes de HPV, y un círculo de color azul (C) haciendo referencia a un control negativo que únicamente contiene agua usada en laboratorios de biología molecular. Evidenciamos también que en este ensayo existen tres muestras invalidadas siendo una de ellas el control interno por lo que se confirmará con el control externo, y en caso de las dos muestras invalidadas se procederá a repetir el ensayo, círculos vacíos marcados de azul harán referencia a casos negativos de portadoras del VPH y círculos rojos vacíos hacen referencia a la presencia de algún genotipo pues así se determina en la región 7F donde constatamos la presencia del genotipo 70 del VPH.



Genotipos del Virus del Papiloma humano encontrados en el laboratorio de biología molecular y determinados en investigaciones previas.

En estudios previos realizados en cantones de la ciudad de Cuenca encontramos una prevalencia de un 3.42% de casos que hacen referencia al genotipo 39, sin embargo en mujeres de nacionalidades indígenas existe un predominio del genotipo 58, en cuanto al genotipo 39 se encontraba en tercer lugar catalogado como genotipo oncogénico, teniendo en cuenta que se trabajó con la misma técnica biomolecular al tratarse de la Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los métodos y técnicas actualmente utilizados en biología molecular para el diagnóstico del VPH hacen mención a la reacción en cadena de la polimerasa sin embargo son limitados los laboratorios que cuentan con equipamiento para realizarlo en tiempo real por lo que un considerable número de laboratorios biomoleculares optan por usar geles de agarosa cuyo inconveniente es el mayor tiempo que se invierte en ella.

## CAPITULO VI

### 6. DISCUSIÓN

La sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa Anyplex HPV 28 viene siendo una de las pruebas con mayor efectividad para el diagnóstico de genotipos de HPV pues en estudios previos realizados por la Journal of Clinical Microbiology evidenció una mayor sensibilidad y especificidad frente a otra técnica diagnóstica PGMY-CHUV, dando como resultado en sensibilidad y especificidad del 99% para la técnica de PCR real Time HPV 28 frente al 93,4% de la PGMY-CHUV. (30)

La concordancia global en tres técnicas biomoleculares analizadas para el diagnóstico de HPV en 166 muestras, entre PCR-EIA, PACR LBH (Line blot hybridization), y HC2 (Hybrid Capture) fue el 73% (36). La técnica biomolecular empleada por esta investigación fue la qPCR real time cuyo nivel de sensibilidad y especificidad supero los 95%, considerándose como uno de los métodos de diagnóstico más eficientes, a más del estricto control de calidad interno empleado.

Un estudio previo realizado en los cantones de la provincia del Azuay, en el que participaron 146 mujeres se obtuvo los siguientes resultados; La prevalencia del VPH encontrada fue de 26,71%. Entre los genotipos de alto riesgo oncogénico identificados están: 39, 53, 59, 45, 68, 16, 52, 58, 66, 31, 33, 69 y 73; y los genotipos de bajo riesgo reconocidos fueron: el 42, 54, 61, 6, 43, 44 y 70. La edad de mayor prevalencia está en el grupo de entre 20 a 29 años. (34)

Sin embargo se limitaron únicamente al diagnóstico del Virus del papiloma humano, en el cual los resultados obtenidos discrepan con resultados obtenidos en nuestra investigación debido al número de participantes y a los genotipos de virus del papiloma humano altamente oncogénicos pues en nuestra investigación sobresale el gen 58 en comparación con la investigación antes mencionada que existe una mayor prevalencia del genotipo 39.

La prevalencia de genotipos más frecuentes, en orden descendente para la presente investigación tenemos los genotipos 58 (9.36%) genotipo 59 (8.77%) genotipo 39 (5.85%) genotipos 16 y 31 (5.26%) seguido de genotipos de bajo riesgo oncogénico en las cuales se evidencio los genotipos 42 (6.43%), genotipo 54(5.26%), genotipo 61 y 6(3.51%), genotipo





70(2.92%). En la investigación realizada en Argentina en el grupo de mujeres de etnia Pilagá encontramos los genotipos 16 (19.4%), 6 y 18 (5.3%). Respecto al genotipo 16 se evidencio un 68.2% de variantes Europeas y un 31.8% de asiático-americanas. (35)

La prevalencia de los genotipos más frecuentes en países latinos fueron Callao Perú 51, 53, 62; la población indígena de la amazonia Venezolana 16 y 33]; Jamaica 45, 58, 16, 35. Hospital Isidro Ayora genotipos de alto riesgo 16, 52, 58 y de genotipos de bajo riesgo 16 y 5. Mujeres de la ciudad de Cuenca Ecuador genotipos de alto riesgo 51, 16, 66, 52, 35, 39, 58, y 68, genotipos de bajo riesgo 42, 43, 6, 11 y 44. (36)

Según los datos sociodemográficos obtenidos por el proyecto de investigación HPV Etnias, el estudio se limitó a emitir resultados obtenidos únicamente en el laboratorio de biología molecular cuyo papel fue el de detectar los genes del virus del papiloma humano así como el uso técnicas biomoleculares para el diagnóstico de microorganismos de transmisión sexual como los mencionados anteriormente, conjuntamente con los datos sociodemográficos de interés, para el laboratorio en los que estuvieron considerados; edad, estado civil, procedencia, nivel de instrucción, etnia, ocupación así como el nivel socioeconómico.

Siendo estos importantes pues contribuyen a la fase pre analítica al momento de realizar cualquier prueba de laboratorio , pues hacen mención a un 50% de error que se reduciría con un correcto llenado de datos y una correcta toma de muestra teniendo que trabajar conjuntamente el personal médico ginecológico, con el personal de laboratorio con la finalidad que tras la obtención de la muestra esta sea conservada adecuadamente evitando alterar el ADN, así mismo fue necesario el uso de viales con búferes amortiguadores que permitieron conservar el ADN y su degradación debido a que el tiempo que transcurría desde la llegada de la muestra al laboratorio estaban entre 6 a 24 horas tras su recolección.

En cuanto a la incidencia de genotipos del virus del papiloma humano y otros microorganismos causantes de infecciones de transmisión sexual, se evidencio que el 23.7% corresponde a mujeres diagnosticadas con genotipos altamente oncogénicos como los descritos en la tabla N°3, así como un 10.4% de mujeres diagnosticadas con genotipos de HPV de bajo riesgo oncogénico.



En cuanto a las infecciones provocadas por microorganismos de transmisión sexual viene siendo algo novedoso en nuestro medio, la aplicación de técnicas biomoleculares para su diagnóstico, pues en su mayoría se las puede evidenciar mediante técnicas inmunohistológicas teniendo estas un bajo nivel de sensibilidad y especificidad, así como la visualización directa por microscopía, tal es el caso de la *Trichomona Vaginalis* la misma que es observada al microscopio como un parásito flagelado con movimiento ondulante.

Sin embargo el uso de técnicas biomoleculares permite diagnosticar de mejor manera la presencia del parásito a más de otros microorganismos, al amplificar una pequeña cantidad de ADN del microorganismo mediante el uso de cebadores (primer) que se complementan con ADN del microorganismo.

En cuanto a la incidencia de microorganismos de transmisión sexual diagnosticados en el laboratorio como lo evidenciamos en la tabla N° 4 están; *Ureaplasma Parvum* 50.28% (182/396); 22,65% de portadoras de *Mycoplasma Hominis* MH; 17.13% de portadoras de

*Ureaplasma Urealyticum* UU; 4.42% de portadoras de *Chlamydia Trachomatis* CT; 4.14% de portadoras de *Trichomonas Vaginalis* TV; 0.83% de portadoras de *Neisseria Gonorrhoeae* NG y un 0.55% de *Mycoplasma Genitalium* MG.

El uso de técnicas biomoleculares en la actualidad viene siendo de gran utilidad al tener un nivel de sensibilidad y especificidad muy alto, al tratarse de analizar directamente el ADN de microorganismos, siendo aplicables en otras áreas médicas, por esta razón uno de los resultados emitidos por el grupo de trabajo de Laboratorio fue la elaboración de un manual práctico para la realización de pruebas biomoleculares en las que se diagnostican microorganismos de transmisión sexual mediante PCR en tiempo real así como medios audiovisuales que permitirán ampliar su conocimiento en el área.

Dada la escasa investigación realizada en la aplicación de técnicas biomoleculares para el diagnóstico de microorganismos de transmisión sexual, se ha limitado únicamente al análisis con técnicas convencionales, siendo la presente investigación pionera en la implementación de la qPCR encaminada a diagnosticar patógenos productores de ITS.



## 7. CONCLUSIONES

El número de casos diagnosticados con genotipos del Virus del papiloma humano en mujeres de nacionalidad indígena del sur del Ecuador fue 135 de un total de 396 representando un 34.09% de la población estudiada.

Entre los genotipos que más incidencia demostró es tubo el genotipo de VPH 58, frente a otros genotipos de alto riesgo y el genotipo 42 entre los genotipos de bajo riesgo oncogénico.

Para el análisis del genotipo de hpv se utilizó 2,5 UI de ADN en cada una de las mezclas (MIX A, B) conjuntamente con cebadores siendo este de 7,5 UI dando un total de 10UI.

El número de mujeres diagnosticadas con microorganismos de transmisión sexual mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa fueron 362 de un total de 396 representando un 91,4% de los cuales hubo una mayor incidencia de Ureaplasma parvum con un 45,96 %.

La población con la que más muestras se procesaron fueron del Cantón Sevilla don Bosco con un total de 145 seguido por la comunidad de Quilloac con 131 muestras y finalmente 120 muestras fueron del cantón Saraguro. De las cuales encontramos un 73% de mujeres cuyas edades fluctuaban entre los 20 a 39 años, en cuanto al estado civil un 42,68 % de mujeres son casadas frente a un 17,68% de mujeres que refieren ser solteras.

Un considerable número de mujeres a las que se les realizó el diagnóstico de microorganismos de transmisión sexual, son trabajadoras no calificadas por lo que se evidencia la escases económica que implica que no puedan acudir a realizarse exámenes biomoleculares, cuya sensibilidad y especificidad es mayor en cuanto al diagnóstico de microorganismos de transmisión sexual.

El material audiovisual elaborado sobre el procedimiento de la realización de la prueba biomolecular Reacción en cadena de la polimerasa, permitirá al estudiante y personal de salud conocer más acerca de la realización de dicha prueba desde el momento que de obtiene la muestra así como el procesamiento en su totalidad la cual implica la extracción del ADN como su posterior amplificación en el termociclador.



## 8. RECOMENDACIONES

Elaborar un mayor número de estudios en mujeres de nacionalidades indígenas que puedan determinar que se trata de variantes genotípicas del VPH en relación a la etnia.

Realizar estudios comparativos entre la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en estudios de microorganismos en comparación con técnicas de visualización microscópica, como lo es el Papanicolaou y otras técnicas tales como inmunofluorescencia, Elisa, así como también la Reacción en cadena de la polimerasa tradicional en la que se requiere más tiempo en el procesamiento

El uso de otro tipo de muestras a más de la cervicouterina con la finalidad de diagnosticar microorganismos de transmisión sexual.

Capacitación continua en técnicas de diagnóstico oportuno encontrando a una de ellas la reacción en cadena de la polimerasa ya que da cabida al diagnóstico de otras patologías al usar cadena de ADN específicos para cada patología.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Infecciones de Transmisión Sexual - EcuRed [Internet]. [Citado 7 de mayo de 2016]. Disponible en: [http://www.ecured.cu/Infecciones\\_de\\_Transmisi%C3%B3n\\_Sexual](http://www.ecured.cu/Infecciones_de_Transmisi%C3%B3n_Sexual)
2. Newman L, Kamb M, Hawkes S, Gomez G, Say L, Seuc A, et al. Global Estimates of Syphilis in Pregnancy and Associated Adverse Outcomes: Analysis of Multinational Antenatal Surveillance Data. Menendez C, editor. PLoS Med. 26 de febrero de 2013;10(2):e1001396.
3. Carlos Pose CP. Enfermedades de transmisión sexual: de la epidemiología a la ética. EIDON [Internet]. 1 de junio de 2016 [citado 2 de abril de 2017]; Disponible en: <http://www.revistaeidon.es/index.php/ficha/126/Enfermedades-de-transmisi%C3%B3n-sexual-de-la-epidemiologia-a-la-etica/>
4. Pimenoff VN, de Oliveira CM, Bravo IG. Transmission between Archaic and Modern Human Ancestors during the Evolution of the Oncogenic Human Papillomavirus 16. Mol Biol Evol. enero de 2017;34(1):4-19.
5. Virus del papiloma, 1985 - info-farmacia [Internet]. [citado 2 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.info-farmacia.com/historia/virus-del-papiloma-1985>
6. Zaldívar Lelo de Larrea G, Martín Molina F, Ferreyra S, Francisco C, Ávila Morales J, Lloret Rivas M, et al. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. Rev Chil Obstet Ginecol. 2012;77(4):315-21.
7. OMS | Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino [Internet]. WHO. [citado 10 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/>
8. Vacuna contra el virus del papiloma humano previene cáncer uterino en el Ecuador [Internet]. Ministerio de Salud Pública. [citado 10 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/vacuna-contra-el-virus-del-papiloma-humano-previene-cancer-uterino-en-el-ecuador/>
9. Silva R, León D, Brebi P, Ili C, Roa JC, Sánchez R. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. Rev Chil Infectol. abril de 2013;30(2):186-92.
10. 3376.pdf [Internet]. [citado 2 de abril de 2017]. Disponible en: <http://eujournal.org/index.php/esj/article/download/3604/3376>
11. 4.2 Estructura Génica [Internet]. [citado 2 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/995/42-estructura-genica>
12. a17fig1.gif (Imagen GIF, 435 × 277 píxeles) [Internet]. [citado 2 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/img/revistas/medba/v73n6/a17fig1.gif>



13. Evans W, Filippova M, Swensen R, Duerksen Hughes P. Modern Molecular and Clinical Approaches to Eradicate HPV Mediated Cervical Cancer. En: Vanden Broeck D, editor. Human Papillomavirus and Related Diseases From Bench to Bedside A Diagnostic and Preventive Perspective [Internet]. InTech; 2013 [citado 2 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/human-papillomavirus-and-related-diseases-from-bench-to-bedside-a-diagnostic-and-preventive-perspective/modern-molecular-and-clinical-approaches-to-eradicate-hpv-mediated-cervical-cancer>
14. Zaldívar Lelo de Larrea G, Martín Molina F, Ferreyra S, Francisco C, Ávila Morales J, Lloret Rivas M, et al. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. Rev Chil Obstet Ginecol. 2012;77(4):315-21.
15. fig09-01.jpg (Imagen JPEG, 493 × 323 píxeles) [Internet]. [citado 2 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v30n2/fig09-01.jpg>
16. Virus del papiloma humano: Información sobre el VPH para los médicos - clinicians\_spanish.pdf [Internet]. [citado 2 de abril de 2017]. Disponible en: [http://www.gawh.org/issues/hpv/clinicians\\_spanish.pdf](http://www.gawh.org/issues/hpv/clinicians_spanish.pdf)
17. de Usuario M. RV16 Detection (V1. 1). [citado 10 de abril de 2017]; Disponible en: <http://m.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/biologia-molecular/anyplexm-ii-rv-16-rv7g01y.pdf>
18. Ureaplasma parvum y ureaplasmosis: Los síntomas y métodos de tratamiento - Sylladys.com [Internet]. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: <http://sylladys.com/es/pages/323398>
19. Infección por Ureaplasma Urealyticum [Internet]. CCM Salud. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: <http://salud.ccm.net/faq/19249-infeccion-por-ureaplasma-urealyticum>
20. Clamidia (Infección genital por Clamidia trachomatis) [Internet]. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: [https://www.health.ny.gov/es/diseases/communicable/chlamydia/fact\\_sheet.htm](https://www.health.ny.gov/es/diseases/communicable/chlamydia/fact_sheet.htm)
21. MYCOPLASMA Y UREAPLASMA [Internet]. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter19.htm>
22. Neisseria gonorrhoeae - Vircell [Internet]. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.vircell.com/enfermedad/40-neisseria-gonorrhoeae/>
23. Mycoplasma Genitalium, la nueva infección de transmisión sexual [Internet]. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.excelsior.com.mx/de-la-red/2016/03/08/1062110>



24. Reid G. Cervicovaginal Microbiomes—Threats and Possibilities. Trends Endocrinol Metab. julio de 2016;27(7):446-54.
25. Factores de riesgo en adolescentes para contraer el virus del papiloma humano [Internet]. [citado 3 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num9/art96/#up>
26. Aplicación de RT-PCR en Tiempo Real para evaluar el efecto de contaminantes en biomarcadores [Internet]. [citado 7 de mayo de 2016]. Disponible en: [https://www.imta.gob.mx/historico/index.php?option=com\\_content&view=article&id=640&Itemid=87](https://www.imta.gob.mx/historico/index.php?option=com_content&view=article&id=640&Itemid=87)
27. PCR en tiempo real - Medicina molecular [Internet]. [citado 7 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://medmol.es/tecnicas/34/>
28. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real - zotero://attachment/3/ [Internet]. [citado 7 de abril de 2016]. Disponible en: zotero://attachment/3/
29. anyplex<sup>tm</sup>-ii-hpv-28-detection-hp7s00x.pdf [Internet]. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/biologia-molecular/anyplex<sup>tm</sup>-ii-hpv-28-detection-hp7s00x.pdf>
30. Estrade C, Sahli R. Comparison of Seegene Anyplex II HPV28 with the PGMY-CHUV Assay for Human Papillomavirus Genotyping. J Clin Microbiol. febrero de 2014;52(2):607-12.
31. Díez M, Díaz A. Infecciones de transmisión sexual: epidemiología y control. Rev Esp Sanid Penit. octubre de 2011;13(2):58-66.
32. OMS | Infecciones de transmisión sexual [Internet]. [citado 9 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>
33. Métodos para detectar el Virus del Papiloma Humano | Eurocytology [Internet]. [citado 9 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.eurocytology.eu/es/course/479>
34. Torres Mercedes Galarza Doris, Ortiz Jose. PREVALENCIA DE LOS GENOTIPOS DEL PAPILOMA VIRUS HUMANO EN MUESTRAS CÉRVICO UTERINAS Y SU RELACIÓN CON LOS FACTORES DE RIESGO EN MUJERES CON VIDA SEXUAL ACTIVA DE LOS CANTONES EL PAN, GUACHAPALA, NABÓN, OÑA, SEVILLA DE ORO Y SIGSIG DE LA PROVINCIA DEL AZUAY. 2014 [Internet] [Pregrado]. [Cuenca]: Universidad de Cuenca; 2014. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/21055/1/TESIS.pdf>
34. Gerardo D. Deluca JB. HUMAN PAPILOMAVIRUS RISK FACTOR FOR INFECTION AND GENOTYPE DISTRIBUTION IN ABORIGINAL WOMEN FROM NORTHERN ARGENTINA. Universidad Nacional del Nordeste. 2012 Enero; 1(1)



35. Cañadas MP. Evaluacion de las tecnicas de deteccion del VPH en los programas de cribado para cancer de cuello uterino. Bosch fx. 2006 febrero.

36. Alfredo Campoverde OCJC. PREVALENCIA DEL GENOTIPO DEL PAPILOMA HUMANO VIRUS EN MUJERES DE CUENCA. Facultad de Ciencias Medicas de la Universidad de Cuenca. 2014 Abril; 32(1).





## 10. ANEXOS

### ANEXO 1

#### Operacionalización de Variables

| VARIABLE                                | DEFINICION  | DIMENSIÓN  | INDICADOR   | ESCALA  |
|---|---|--|---|---|
| Edad                                    | Tiempo de vida de una persona desde su nacimiento hasta la fecha.   | Años cumplidos                                     | Fecha de nacimiento visualizada en la cedula.             | 15 – 20<br>21 – 29<br>30 – 39<br>39 – 45  |
| Residencia                              | Lugar que vive actualmente la persona, siendo esta mayor a 6 meses.   | Ubicación Geográfica                               | Formulario aplicado a las participantes.                  | Quilloac<br>Sevilla Don Bosco<br>Saraguro   |
| Estado civil                            | Condición de una persona según el registro civil, en función si tiene o no tiene pareja.                          | Relación familiar                                  | Cédula de Identidad                                       | Soltera<br>Casada<br>Viuda<br>Divorciada<br>Unión libre   |
| Nivel de instrucción                    | Grado de estudios realizados o en curso.  | Estatus de educación.                              | Formulario aplicado a las participantes                   | Ninguno<br>Primario<br>Secundario<br>Tercer nivel<br>Cuarto nivel   |
| Genotipos del virus del papiloma humano | Es un virus pequeño con doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) que pertenece a la familia Papovaviridae. | Identificación del genotipo del HPV                | Secuenciamiento del HPV por PCR real time                 | Hpv alto riesgo: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82.<br>Hpv bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72. |
| Patógenos causantes de ETS              | Microorganismos causantes de lesiones inflamatorias, 7 principales patógenos causantes de ETS.                    | Identificación del microorganismo causante de ETS. | Secuenciamiento de los microorganismos por PCR Real Time. | <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT),<br><i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG),<br><i>Trichomonas vaginalis</i> (TV),<br><i>Mycoplasma</i>                     |




|                             |  |                            |   |  |
|-----------------------------|--|----------------------------|---|--|
|                             |  |                            |   | <i>hominis (MH), Mycoplasma genitalium (MG), Ureaplasma urealyticum (UU), y Ureaplasma parvum (UP)</i> |
| Número de embarazos.        | Cantidad de embarazos, Embarazo: Periodo transcurrido entre la implantación del cigoto hasta el momento del parto. | Número total de embarazos. | Formulario aplicado a las participantes | 1<br>2<br>3<br>más de 4  |
| Número de parejas sexuales. | Personas con la que ha mantenido relaciones sexuales.  |                            | Formulario aplicado a las participantes | 1<br>2<br>3<br>más de 4  |
| Uso de anticonceptivos      | Método que impide el embarazo  |                            | Formulario aplicado a las participantes | Si<br>No   |
| Inicio de Vida sexual       | Edad cronológica en que la mujer ha empezado con su vida sexual.   |                            | Formulario aplicado a las participantes | Menor a 15 años.<br>16 – 20 años.<br>21 – 25 años<br>26 – 30 años.<br>Mayor a 30 años.                 |



## ANEXO 2

Registro de laboratorio

QPCR – HPV28 N°: \_\_\_\_\_

| LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR   |       |   |   | PROTOCOLO QPCR - HPV28.<br>UBICACIÓN DE MUESTRAS.<br>Fecha: |   |   |       |   |   |    |    |    |
|---|-------|---|---|---|---|---|-------|---|---|----|----|----|
|  | MIX A |   |   |   |   |   | MIX B |   |   |    |    |    |
|   | 1     | 2 | 3 | 4   | 5 | 6 | 7     | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A   |       |   |   |   |   |   |       |   |   |    |    |    |
| B   |       |   |   |   |   |   |       |   |   |    |    |    |
| C   |       |   |   |   |   |   |       |   |   |    |    |    |
| D   |       |   |   |   |   |   |       |   |   |    |    |    |
| E   |       |   |   |   |   |   |       |   |   |    |    |    |
| F   |       |   |   |   |   |   |       |   |   |    |    |    |
| G   |       |   |   |   |   |   |       |   |   |    |    |    |
| H   |       |   |   |   |   |   |       |   |   |    |    |    |

|        |  |                                     |        |  |
|--------|--|-------------------------------------|--------|--|
| COCT A |  | MIX<br>7,5 ul<br>+<br>ADN<br>2.5 ul | COCT B |  |
| TOM A  |  |                                     | TOM A  |  |
| MIX    |  |                                     | MIX    |  |
| H2O    |  |                                     | H2O    |  |
| total  |  |                                     | total  |  |

OBSERVACIONES:


\_\_\_\_\_

Laboratorista responsable: .....

Firma:.....



QPCR – STI-7 N°: \_\_\_\_\_

| LABORATORIO DE<br>BIOLOGÍA MOLECULAR  |                 |   |   | PROTOCOLO QPCR – STI-7.<br>UBICACIÓN DE MUESTRAS. |   |   |   |   |   |    |    |    |
|---|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|  | PLACA PCR STI-7 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   | 1               | 2 | 3 | 4   | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

|                           |  |           |
|---------------------------|--|-----------|
| MIX                       |  | MIX       |
| 4X STI-7 TOM              |  | 7,5 ul    |
| Rnase-Free Water          |  | +         |
| 4X Anyplex PCR Master MIX |  | ADN       |
| Total                     |  | 2.5 ul    |
|                           |  | 10 ul C/T |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| U. urealyticum (UU)   |  |
| U. parvum (UP)        |  |
| M. genitalum (MG)     |  |
| M. hominis (MH)       |  |
| N. gonorrhoeae (NG)   |  |
| C. trachomatis (CT)   |  |
| T. vaginalis (TV)     |  |
| Internal Control (IC) |  |

: OBSERVACIONES

\_\_\_\_\_

Laboratorista responsable: ..... Firma:.....



## ANEXO 3

### OFICIOS PARA AUTORIZACIÓN

Cuenca, Junio 1 del 2016

Dr.

José Ignacio Ortiz Segarra

Director del Proyecto “Diseño de un programa de promoción de salud sexual y reproductiva y de prevención de VPH y de enfermedades de transmisión sexual para mujeres de Pueblos y Nacionalidades Indígenas KYCHWA y SHUAR del Ecuador, año 2015-2017.”

Presente.-

Asunto: Solicitud de autorización para la elaboración de tesis A3 (Pregrado)

Nosotros: John Patricio Caguana Mayancela, Christian Santiago Carreño Calle alumnos de la Universidad de Cuenca, de octavo semestre de la carrera de Laboratorio Clínico solicitamos a Ud. Dr. José Ignacio Ortiz Segarra nos brinde la autorización respectiva para la elaboración de un proyecto de tesis de Pregrado previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico, el mismo que llevara por nombre: PCR tiempo Real para el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual en muestras cervico uterinas de mujeres de Nacionalidades Indígenas KYCHWA y SHUAR del Ecuador 2016.

Razón por la cual esperamos nos brinde su autorización.

Atentamente

.....  
John Caguana Mayancela

.....  
Christian Carreño Calle



## ANEXO 4

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Los profesores de la Universidad de Cuenca (DIUC) realizamos esta Investigación con la finalidad de determinar la frecuencia de enfermedades de transmisión sexual y el Virus del Papiloma Humano, en muestras del cuello del útero de mujeres en etapa reproductiva, pertenecientes a las comunidades de Sevilla Don Bosco en la provincia de Morona Santiago, Quilloac en Cañar y Saraguro en Loja. En esta oportunidad nos interesa conocer lo que Usted y las demás mujeres de esta comunidad piensan y realizan acerca de su salud sexual y reproductiva. La entrevista grupal que realizaremos ahora, tendrá una duración de aproximadamente 90 minutos. Además deseáramos saber si usted estaría dispuesta para que, a partir del mes de Agosto, uno de los médicos ginecólogos del proyecto procedan a realizarle un examen ginecológico sin riesgo alguno para su salud y que tendrá como finalidad obtener una muestra de la secreción del cuello del útero, la misma que servirá para realizar un examen conocido con el nombre de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los exámenes de laboratorio, que se realizarán en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca, determinarán si Ud. tiene o no el Virus del Papiloma causante del cáncer del útero, así como otras infecciones causadas por *Chlamydia*, *N. gonorrhoeae*, *Trichomona Vaginalis*, *Mycoplasma* y *Ureaplasma*.

La participación en este estudio es voluntaria, la información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. La entrevista, no tendrán ningún costo, y los resultados de los análisis le entregarán personalmente en el consultorio, en la fecha que el médico lo determine.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación. Igualmente, puede retirarse del mismo en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma.

Si algunas de las preguntas de la entrevista le parecen incómodas y considera que afectan a su sensibilidad, usted tiene el derecho de hacérselo saber al investigador o no responderlas. Su participación le brindará a Ud. importantes beneficios ya que la investigación permitirá detectar si está libre de enfermedades de transmisión sexual o no tiene los virus causantes del cáncer del cuello uterino. En caso de tener resultados positivos para la enfermedad se le remitirá a un centro del Ministerio de Salud, para confirmar el diagnóstico y realizar el tratamiento más adecuado.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación una vez que he sido informada de los objetivos y metas de este estudio, que me realizarán un examen ginecológico para obtener una muestra de la secreción del cuello del útero para examen de PCR; que el mencionado examen no implica riesgo alguno para mi persona, que los resultados me entregarán y que tendré que responder un cuestionario en una entrevista realizada en el consultorio médico. Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito, fuera de los de este estudio, sin mi consentimiento. Para constancia de lo antes expuesto, registro mi firma o huella digital.

\_\_\_\_\_ Nombre y firma o huella digital de la participante

\_\_\_\_\_ Nombre y firma del/a

Investigador/a Lugar: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO 5

### Formulario de registro de pacientes



PROYECTO: Diseño de un programa de promoción de salud sexual y reproductiva y de prevención de VPH y de enfermedades de transmisión sexual para mujeres de Pueblos y Nacionalidades Indígenas KYCHWA y SHUAR del Ecuador, año 2015-2017

FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE DATOS Etnia: Kañari ☐ Shuar ☐ Saraguro ☐ Código

**Confidencialidad:** los datos proporcionados por la informante son estrictamente confidenciales y serán utilizados únicamente con fines estadísticos de acuerdo al artículo 21 de la ley de estadística.

Nombre del/a entrevistador/a \_\_\_\_\_ Lugar: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora de inicio: \_\_\_\_:\_\_\_\_

#### 1. Características demográficas y socioeconómicas

- 1.1. Nombres completos de la mujer: \_\_\_\_\_ 1.2. Edad en años cumplidos: \_\_\_\_\_  
1.3. Número de cédula \_\_\_\_\_ 1.4. Número de historia clínica \_\_\_\_\_  
1.5. Estado civil: Soltera ☐ Casada ☐ Viuda ☐ Divorciada ☐ Unión libre ☐ 1.6. Fecha de nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
1.7. Fecha de la última menstruación \_\_\_\_\_ 1.8. Número de embarazos \_\_\_\_\_ Partos \_\_\_\_\_ Abortos \_\_\_\_\_  
1.9. Lugar de procedencia: Provincia \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_  
1.10. Residencia: Provincia \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_ Vivienda: Latitud: \_\_\_\_\_ Longitud: \_\_\_\_\_  
1.11. Teléfono del domicilio: \_\_\_\_\_ Teléfono celular: \_\_\_\_\_  
1.11. Señale con quien vive actualmente: Vive sola ☐ Con la pareja ☐ Con hijo(s) ☐ Con padre ☐ Con madre ☐  
Con Hermano(s) ☐ Con otros familiares ☐ Con otras personas ☐ →cuáles \_\_\_\_\_  
1.12. Trabaja No ☐ Si ☐ → En qué trabaja: \_\_\_\_\_  
1.14. Está jubilada No ☐ Si ☐ → De qué se jubiló \_\_\_\_\_  
1.15. Último nivel de instrucción: Ninguno ☐ Centro de alfabetización ☐ Primaria ☐ Secundaria ☐ Tercer nivel ☐ Cuarto nivel ☐  
No sabe ☐ No contesta ☐

#### 2. Estratificación del nivel socioeconómico

0 D (Bajo)

##### 2.1. Características de la vivienda

- 2.1.1. Características de la vivienda: Suite de lujo ☐ 59 Cuarto(s) en casa o inquilinato ☐ 59 Departamento en casa o edificio ☐ 59  
Casa/Villa ☐ 59 Mediagua ☐ 40 Rancho ☐ 4 Chozal/Covacha/Otro ☐ 0  
2.1.2. El material predominante de las paredes exteriores de la vivienda es de: Hormigón ☐ 59 Ladrillo o bloque ☐ 55  
Adobe/ Tapia ☐ 47 Caña revestida o bahareque/ Madera ☐ 17 Caña no revestida/ Otros materiales ☐ 0  
2.1.3. El material predominante del piso de la vivienda es de: Duela, parquet, tablón o piso flotante ☐ 48 Cerámica, baldosa, vinil o marmetón ☐ 46 Ladrillo o cemento ☐ 34 Tabla sin tratar ☐ 32 Tierra/ Caña/ Otros materiales ☐ 0  
2.1.4. ¿Cuántos cuartos de baño con ducha de uso exclusivo tiene este hogar?  
No tiene cuarto de baño exclusivo con ducha en el hogar ☐ 0 Tiene 1 cuarto de baño exclusivo con ducha ☐ 12  
Tiene 2 cuartos de baño exclusivos con ducha ☐ 24 Tiene 3 o más cuartos de baño exclusivos con ducha ☐ 32  
2.1.5. El tipo de servicio higiénico: No tiene ☐ 0 Letrina ☐ 15 Con descarga directa al mar, río, lago o quebrada ☐ 18  
Conectado a pozo ciego ☐ 18 Conectado a pozo séptico ☐ 22 Conectado a red pública de alcantarillado ☐ 38

##### 2.2. Acceso a la tecnología

- 2.2.1. ¿Tiene este hogar servicio de internet? No ☐ 0 Si ☐ 45  
2.2.2. ¿Tienen computadora de escritorio? No ☐ 0 Si ☐ 35  
2.2.3. ¿Tiene computadora portátil? No ☐ 0 Si ☐ 39  
2.2.4. ¿Cuántos celulares activados tienen en este hogar? No tiene celular nadie en el hogar ☐ 0 Tiene 1 celular ☐ 8  
Tiene 2 celulares ☐ 22 Tiene 3 celulares ☐ 32 Tiene 4 o más celulares ☐ 42

##### 2.3. Posesión de bienes

- 2.3.1. ¿Tiene este hogar servicio de teléfono convencional? No ☐ 0 Si ☐ 19  
2.3.2. ¿Tiene cocina con horno? No ☐ 0 Si ☐ 29  
2.3.3. ¿Tiene refrigeradora? No ☐ 0 Si ☐ 30





- 2.2.4. ¿Tiene lavadora? No ☐ 0 Si ☐ 18  
2.2.5. ¿Tiene equipo de sonido? No ☐ 0 Si ☐ 18  
2.2.6. ¿Cuántos TV a color tienen en este hogar? No tiene TV a color en el hogar ☐ 0 Tiene 1 TV a color ☐ 9  
Tiene 2 TV a color ☐ 23 Tiene 3 o más TV a color ☐ 34  
2.2.7. ¿Cuántos vehículos de uso exclusivo tiene este hogar? No tiene vehículo exclusivo para el hogar ☐ 0  
Tiene 1 vehículo exclusivo ☐ 6 Tiene 2 vehículos exclusivos ☐ 11 Tiene 3 o más vehículos exclusivos ☐ 15

## 2.3. Hábitos de consumo

- 2.3.1. ¿Alguien en el hogar compra vestimenta en centros comerciales? No ☐ 0 Si ☐ 6  
2.3.2. ¿En el hogar alguien ha usado internet en los últimos 6 meses? No ☐ 0 Si ☐ 26  
2.3.3. ¿En el hogar alguien utiliza correo electrónico que no es del trabajo? No ☐ 0 Si ☐ 27  
2.3.4. ¿En el hogar alguien está registrado en una red social? No ☐ 0 Si ☐ 28  
2.3.5. Exceptuando los libros de texto o manuales de estudio y lecturas de trabajo. ¿Alguien del hogar ha leído algún libro completo en los últimos 3 meses? No ☐ 0 Si ☐ 12

## 2.4. Nivel de educación

- 2.4.1. ¿Cuál es el nivel de instrucción del Jefe del hogar? Sin estudios ☐ 0 Primaria incompleta ☐ 21 Primaria completa ☐ 39  
Secundaria incompleta ☐ 41 Secundaria completa ☐ 65 Hasta 3 años de educación superior ☐ 91  
4 o más años de educación superior (sin post grado) ☐ 127 Postgrado ☐ 171

## 2.5. Actividad económica del hogar

- 2.5.1. ¿Alguien en el hogar está afiliado o cubierto por el seguro del IESS (general, voluntario o campesino) y/o seguro del ISSFA o ISSPOL? No ☐ 0 Si ☐ 39  
2.5.2. ¿Alguien en el hogar tiene seguro de salud privada con hospitalización, seguro de salud privada sin hospitalización, seguro internacional, seguros municipales y de Consejos Provinciales y/o seguro de vida? No ☐ 0 Si ☐ 55  
2.5.3. ¿Cuál es la ocupación del Jefe del hogar? Personal directivo de la Administración Pública y de empresas ☐ 76  
Profesionales científicos e intelectuales ☐ 69 Técnicos y profesionales de nivel medio ☐ 46 Empleados de oficina ☐ 31  
Trabajador de los servicios y comerciantes ☐ 18 Trabajador calificado agropecuario y pesquero ☐ 17 Oficiales operarios y artesanos ☐ 17  
Operadores de instalaciones y máquinas ☐ 17 Trabajadores no calificados ☐ 0 Fuerzas Armadas ☐ 54 Desocupados ☐ 14 Inactivos ☐ 17

## 3. Factores de riesgo

- 3.1. Estado nutricional. Peso en kg  Talla cm  IMC    
3.2. Inicio de la vida sexual. ¿A qué edad tuvo su primera relación sexual? Edad en años   
3.3. Edad con primer parto. ¿A qué edad tuvo su primer parto? Edad en años   
3.4. ¿Cuántos embarazos ha tenido? 3.5. ¿Cuántos partos ha tenido? 3.6. ¿Cuántos abortos ha tenido?   
3.7. ¿Cuánto compañeros sexuales ha tenido usted en toda su vida?   
3.8. ¿Su pareja, ha tenido más compañeras sexuales? No ☐ Si ☐ → Cuántas:  No sabe ☐   
3.9. ¿Utiliza algún método anticonceptivo? No ☐ Si ☐ → Cuál:  Durante qué tiempo:  (meses)   
3.10. ¿Ha tomado pastillas anticonceptivas? No ☐ Si ☐ → Cuál:  Durante qué tiempo:  (meses)   
3.11. ¿Se ha colocado algún dispositivo intrauterino? No ☐ Si ☐ → Cuál:  Durante qué tiempo:  (meses)   
3.12. ¿Ha utilizado usted o su pareja preservativos? No ☐ Si ☐ → Durante qué tiempo:  (meses)   
3.13. ¿Ha usado usted otro método anticonceptivo? No ☐ Si ☐ → Cuál:  Durante qué tiempo:  (meses)   
3.14. ¿Ha tenido secreción vaginal patológica? No ☐ Si ☐ → Durante qué tiempo:  (Especifique: años, meses o días)   
3.15. ¿Ha tenido alguna enfermedad de transmisión sexual? No ☐ Si ☐ → Cuál:    
3.16. Se ha realizado el examen de Papanicolaou: No ☐ Si ☐ → Hace qué tiempo:  (meses)   
3.17. En caso de que no se haya realizado, ¿por qué?    
3.18. ¿Ha tenido resultados de Papanicolaou alterado: No ☐ No sabe ☐ Si ☐ → Cuál:

22/10/2015

2

v 8.1





- 3.19. ¿Ha recibido tratamiento por problemas en el cuello uterino?, como Cauterizaciones ☐ Otro ☐ →Cuál \_\_\_\_\_ No ☐
- 3.20. ¿Toma usted alguna medicación? No ☐ Si ☐ →Cuál(es) \_\_\_\_\_
- 3.21. ¿Usted fuma cigarrillos? No ☐ Si ☐ → Cuántos cigarrillos al día ☐ ☐
- 3.22. ¿Los médicos le han diagnosticado a usted de Diabetes? No ☐ Si ☐
- 3.23. ¿Los médicos le han diagnosticado a usted de Hipotiroidismo? No ☐ Si ☐
- 3.24. ¿Usted toma corticoides? No ☐ Si ☐ (ver lista de corticoides en anexo)
- 3.25. ¿Usted toma inmunosupresores No ☐ Si ☐ (ver lista de inmunosupresores en anexo)
- 3.26. ¿Ha recibido vacuna para VPH? No ☐ Si ☐ → hace qué tiempo: \_\_\_\_\_ (meses)
- 3.27. ¿Alguien de su familia ha sido diagnosticada de cáncer de cuello uterino? No ☐ Si ☐ →Cuál familiar: \_\_\_\_\_

Fecha de la toma de muestra \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ y hora de finalización: \_\_\_\_:\_\_\_\_

Nombre y firma del(a) entrevistador(a) \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Correo electrónico del(a) entrevistador(a) \_\_\_\_\_

Correo electrónico de la paciente: \_\_\_\_\_



## ANEXO 6

### Formulario de Reporte de Resultados de Laboratorio



PROYECTO: Diseño de un programa de promoción de salud sexual y reproductiva y de prevención de VPH y de enfermedades de transmisión sexual para mujeres de Pueblos y Nacionalidades Indígenas KYCHWA y SHUAR del Ecuador, año 2015-2017

#### FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código 131SHM

**Confidencialidad:** los datos proporcionados por la informante son estrictamente confidenciales y serán utilizados únicamente con fines estadísticos de acuerdo al artículo 21 de la ley de estadística.

1. Nombres completos de la mujer: \_\_\_\_\_

2. Etnia: Kañari ☐ Shuara ☒ Saraguro ☐

3. Edad en años: \_\_\_\_\_ Fecha de la última menstruación: \_\_\_\_\_ Número de embarazos: \_\_\_\_\_ Partos: \_\_\_\_\_ Abortos: \_\_\_\_\_

4. Residencia: Provincia: Morona Santiago Cantón: MORONA ¿Utiliza algún método anticonceptivo? No ☐ Si ☐

5. Número de cédula: \_\_\_\_\_ 6. Número de historia clínica: \_\_\_\_\_

7. Teléfono del domicilio: \_\_\_\_\_ Teléfono celular: \_\_\_\_\_

8. Nombre del médico que tomó la muestra LORENA MUÑOZ Lugar: MACAS Fecha: 10 / 03 / 2016

9. Genotipo(s) identificado(s) de alto riesgo

|  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|
| 16 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 18 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 26 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 31 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 33 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 35 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 39 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |
| 45 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 51 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 52 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 53 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 56 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 58 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 59 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |
| 66 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 68 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 69 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 73 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 82 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Ninguno <input type="checkbox"/>                           |  |

10. Genotipo(s) identificado(s) de bajo riesgo

|  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|
| 6 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>  | 11 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 40 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 42 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 43 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 44 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 54 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |
| 61 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | 70 Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Ninguno <input type="checkbox"/>                           |  |  |  |  |

11. Patógenos de transmisión sexual(ETS): Ninguno ☐ Si ☐ No ☐

|  |  |   |
|--|--|---|
| Chlamydia trachomatis(CT) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>  | Mycoplasma hominis (MH) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>    | Ureaplasma urealyticum (UU) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |
| Neisseria gonorrhoeae (NG) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Mycoplasma genitalium (MG) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Ureaplasma parvum (UP) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>      |
| Trichomonas vaginalis (TV) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |  |   |

12. Nombre del laboratorista MAGISTER ALFREDO CAMPOVERDE Lugar: CUENCA Fecha: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR

13. Infecciones:

|   |  |   |
|---|--|---|
| Flora normal Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>  | Flora mixta Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>  | Trichomonas vaginalis Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |
| Gardnerella Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>   | Leptothrix Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>   | Cándida Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>               |
| Actinomicetes Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Herpes Virus Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Chlamydia trachomatis Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |

14. Clasificación de Bethesda: Citología Normal Si ☐ No ☐

|   |   |
|---|---|
| ASC-US Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>            | ASC-H Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>             |
| AGC-NOS Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>           | AGC-N Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>             |
| LIE de bajo grado Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | LIE de alto grado Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |
| Carcinoma Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>         | Adenocarcinoma Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>    |

15. Muestra satisfactoria Si ☐ No ☐

16. Evaluación Hormonal:

|  |   |   |
|--|---|---|
| Frotis trófico Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Frotis citológico Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Frotis atrófico Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |
| (estrogénico)  | (progestágeno)  |   |

17. Hallazgos misceláneos:

|  |  |   |
|--|--|---|
| Inflamación Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>            | Vaginosis Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>                      | Atrofia Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |
| Cambios post-radiación Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | Cambios asociados a uso de DIU Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |   |

18. Nombre del laboratorista DRA ROCIO MURILLO Lugar: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

LABORATORIO CITOLOGÍA

19. Envío de resultados

PACIENTE: \_\_\_\_\_

MEDICO: \_\_\_\_\_

Notificación paciente

Enviar resultados

## ANEXO 7

Equipo utilizado para la amplificación del ADN

TERMOCICLADOR BIORAD



Equipo de investigadores en Saraguro



Equipo de investigadores en Macas



Recolección de Datos sociodemográficos en Macas







## Procesamiento de muestras en el Laboratorio de Biología Molecular

